

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais e exsudatos de três espécies de *Salvia* (*S. uliginosa* Benth, *S. procurrens* Benth., *S. ovalifolia* A. ST.-HIL) coletadas no estado do Rio Grande do Sul.

CRISTIANO DA SILVA SOUSA

PORTO ALEGRE, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais e exsudatos de três espécies de *Salvia* (*S. uliginosa* Benth, *S. procurrens* Benth. *S. ovalifolia* A. ST.-HIL) coletadas no estado do Rio Grande do Sul.

Dissertação apresentada por **Cristiano da Silva Sousa** para obtenção do GRAU DE MESTRE em ciências farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Anders Apel

PORTO ALEGRE, 2022

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de setembro de 2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Gabriela Meirelles
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Renata Vidor Contri
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Sousa, Cristiano da Silva
Avaliação da atividade antifúngica dos óleos
essenciais e exsudatos de três espécies de Salvia (S.
uliginosa Benth, S. procurrens Benth., S. ovalifolia
A. ST.-HIL) coletadas no estado do Rio Grande do Sul.
/ Cristiano da Silva Sousa. -- 2022.
70 f.
Orientadora: Miriam Anders Apel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Óleos Essenciais . 2. Exsudato. 3. Salvia. 4.
Atividade Antifúngica . 5. Óleos voláteis . I. Apel,
Miriam Anders, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia e de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico esse trabalho aos meus pais, apesar da distância
reconheço todo seu amor e apoio.
Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me manter confiante nos momentos felizes e nos de dificuldade.

A professora Dra. Miriam Anders Apel, por sua orientação, ensinamentos, pela sua paciência, apoio e disponibilidade em todos os momentos.

A professora Dra. Gilsane Lino von Poser, por sua disponibilidade em ajudar, ensinar, e apoiar esse trabalho.

Ao botânico Sergio Bordignon, por seu auxílio e disponibilidade para coletar as plantas usadas nesse trabalho.

A meu Marido Luiz Eduardo Macedo do Monte, por sua paciência, compreensão, confiança e ajuda em todos os momentos.

Aos meus colegas do laboratório de farmacognosia, pela disponibilidade de ajuda e apoio durante toda essa caminhada. Aos colegas do grupo “Quintas Essenciais” as reuniões que ali aconteceram foram muito enriquecedoras. Agradeço pelas amizades construídas e gostaria de dizer que sou um grande admirador do profissionalismo e caráter de todos vocês.

Agradecimento especial para Sita, Lana e Juliana por estarem sempre disponíveis a ajudar, pela força dada e pela confiança.

RESUMO

Espécies do gênero *Salvia* são plantas conhecidas no mundo inteiro, e desde tempos remotos muito usadas na medicina tradicional para tratar diversos problemas de saúde. Na atualidade, as indústrias alimentícia e farmacêutica têm demonstrado interesse em seus compostos. Em relação à composição química, estas espécies se caracterizam pela produção de óleos voláteis, que são misturas complexas de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, podendo, ainda, apresentar alguns diterpenos em sua constituição. Biologicamente, os óleos voláteis vêm demonstrando relevante atividade antimicrobiana. No cenário atual, a fim de sanar os problemas de resistência microbiana, é necessário incrementar a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antibiótica, visando aumentar o arsenal medicamentoso de defesa a microrganismos patogênicos. Tendo em vista a importância da identificação de novas substâncias com atividade antifúngica e buscando alternativas terapêuticas efetivas, o presente trabalho objetivou a caracterização química por CG-EM e a avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil obtidos das partes aéreas das espécies *Salvia ovalifolia*, *Salvia procurrens* e *Salvia uliginosa* encontradas no Rio Grande do Sul, frente a espécies de *Candida*. Foi também avaliada a atividade antifúngica de exsudatos das duas últimas espécies, bem como de um diterpeno, a icetexona, previamente obtido destas espécies. No presente estudo foi possível observar certa semelhança entre os constituintes das três espécies, sendo o nonadecanal e o ácido hexadecanóico componentes comuns a todos. A atividade anti-*Candida* dos óleos voláteis, do exsudato e do isolado foi realizada pela técnica de difusão em disco, sendo observada ação apenas para o exsudato e isolado icetexona obtidos de *Salvia uliginosa*, que inibiram *Candida albicans*. A partir deste resultado, a concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada e o exsudato de *Salvia uliginosa* apresentou MIC de 250 µg/ml e o diterpeno icetexona 500 µg/ml em 24 horas. Este estudo confirma a caracterização química do óleo volátil pela presença de compostos terpenos alifáticos e diterpenos, apresentando este último grupo ação promissora frente a *C. albicans*.

Palavras-chave: *Salvia* spp.; óleos voláteis; diterpenos, *Candida* spp.

ABSTRACT

Species of the genus *Salvia* are plants known all over the world, and since ancient times they have been used in traditional medicine to treat various health problems. Currently, the food and pharmaceutical industries have shown interest in their compounds. Regarding the chemical composition, these species are characterized by the production of volatile oils, which are complex mixtures of monoterpenes, sesquiterpenes, phenylpropanoids, and may also have some diterpenes in their constitution. Biologically, volatile oils have demonstrated relevant antimicrobial activity. In the current scenario, in order to deal with the problems of microbial resistance, it is necessary to increase research for the development of new drugs with antibiotic action, aiming to increase the drug arsenal of defense against pathogenic microorganisms. Considering the importance of identifying new substances with antifungal activity and seeking effective therapeutic alternatives, the present study was focused at the chemical characterization by GC-MS and the evaluation of the antifungal activity of the volatile oil obtained from the aerial parts of the species *Salvia ovalifolia*, *Salvia procurrens* and *Salvia uliginosa* native to Rio Grande do Sul, against *Candida* species. The antifungal activity of exudates from the last two species was also evaluated, as well as a diterpene, icetexone, previously obtained from these species. In the present study, it was possible to observe a certain similarity between the constituents of the three species, with nonadecanal and hexadecanoic acid components common to all. The anti-*Candida* activity of the volatile oils, the exudate and the isolate were performed by the disk diffusion technique, and action was observed only for the exudate of *Salvia uliginosa* and the diterpene icetexone, which inhibited *Candida albicans*. From this result, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined and the exudate of *Salvia uliginosa* exhibited a MIC of 250 µg/mL and the diterpene icetexone, 500 µg/mL in 24 hours. This study confirms the chemical characterization of the volatile oil by the presence of aliphatic terpene and diterpene compounds, the latter group showing a promising action against *C. albicans*.

Keywords: *Salvia* spp.; volatile oils; diterpenes, *Candida* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: ligações do tipo cabeça-cauda e ligações não-cabeça-cauda (LUDWICZUK et al.,2017).....27
- Figura 2: Rota biossintética dos terpenoides (CHENG et al., 2007).....28
- Figura 3: . Exemplos estruturais de monoterpenoides (MAHMOUD; CROTEAU et al., 2002).....29
1
- Figura 4: Exemplos estruturais de sesquiterpenoides (CROTEAU et al.,2003).....30
- Figura 5: Exemplos de diterpenoides (CROTEAU et al., 2003).....31
- Figura 6. *Salvia procurrens*, foto - Sergio Bordignon.....34
- Figura 7. *Salvia uliginosa*, foto - Sergio Bordignon.....35
- Figura 8. *Salvia ovalifolia*, foto - Sergio Bordignon.....36
- Figura 9. . Partes aéreas das salvias usadas para a extração no aparelho Clevenger: imagem 1 *S. uliginosa* fresca; 4 *S. uliginosa* seca. 2 e 3 *S. ovalifolia* frescas. 5 *S. procurrens* fresca; 6 *S. procurrens* seca.43
- Figura 10. Concentrados de óleos essenciais vistos já nas primeiras horas de extração. 1 e 3: *S. procurrens*; 2 e 4: *S. uliginosa*.....44
- Figura 11. Da esquerda para a direita: 1 *S. procurrens* fresca; 2 *S. procurrens* seca, 3 *S. uliginosa* fresca; *S. uliginosa* seca, *S. ovalifolia* fresca.....45
- Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de *S. procurrens* partes aéreas frescas obtido por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM). ..46
- Figura 13. . Cromatograma do óleo essencial de *S. procurrens* partes aéreas secas obtido por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM). ..47
- Figura 14. Cromatograma do óleo essencial de *S. ovalifolia* partes aéreas frescas obtido por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM). ..49
- Figura 15. . Cromatograma do óleo essencial de *S. uliginosa* partes aéreas frescas obtido por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM). ..50
- Figura 16. Cromatograma do óleo essencial de *S. uliginosa* partes aéreas frescas obtido por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM). ..51

Figura 17. <i>Salvia procurrens</i> ressecada usada para o exsudato.....	53
Figura 18. <i>Salvia uliginosa</i> ressecada usada para o exsudato.....	53
Figura 19. Filtração dos exsudatos, demonstrando coloração característica. 1 <i>S. procurrens</i> e 2 <i>S. uliginosa</i>	54
Figura 20. Exsudatos de <i>S. procurrens</i> e <i>S. uliginosa</i> . 1 <i>S. uliginosa</i> , 2 <i>S. procurrens</i>	55
Figura 21. Controle negativo; 1 <i>C. albicans</i> , 2 <i>C. dublinienses</i> , 3 <i>C. krusei</i> , 4 <i>C. glabrata</i> , 5 <i>C. parapsilosis</i> , 6 <i>C. tropicalis</i> , 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.....	56
Figura 22. Controle positivo contendo itraconazol; 1 <i>C. albicans</i> , 2 <i>C. ccc</i> , 3 <i>C. glabrata</i> , 4 <i>C. krusei</i> , 5 <i>C. parapsilosis</i> , 6 <i>C. tropicalis</i> , 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.	56
Figura 23. Placas contendo exsudato de <i>S. uliginosa</i> ; 1 <i>C. albicans</i> , 2 <i>C. dublinienses</i> , 3 <i>C. glabrata</i> , 4 <i>C. krusei</i> , 5 <i>C. parapsilosis</i> , 6 <i>C. tropicalis</i> , 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.	566
Figura 24. Placas contendo o isolado icetexona; 1 <i>C. albicans</i> , 2 <i>C. dublinienses</i> , 3 <i>C. glabrata</i> , 4 <i>C. krusei</i> , 5 <i>C. parapsilosis</i> , 6 <i>C. tropicalis</i> , 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de coleta das três espécies de <i>Salvia</i> encontrados no Rio Grande do Sul.....	44
Tabela 2. Composição percentual do óleo essencial de <i>S. procurrens</i> , obtido de partes aéreas frescas.....	46
Tabela 3. Composição química do óleo essencial de <i>S. procurrens</i> partes aéreas secas.....	47
Tabela 4. Caracterização química do óleo essencial de <i>S. ovalifolia</i> obtidas das partes aéreas frescas.....	49
Tabela 5. Composição química do óleo essencial das partes aéreas frescas de <i>S. uliginosa</i>	50
Tabela 6. Composição química do óleo essencial das partes aéreas secas de <i>S. uliginosa</i>	52
Tabela 7. Resultados do experimento do MIC com óleos volateis das três espécies de <i>Salvias</i>	57
Tabela 8. MIC para confirmação do resultado com icetrexona e exsudato de <i>S. uliginosa</i> frente a <i>Candida albicans</i>	58

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO GERAL	23
2.1 Objetivos Específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	245
3.1. Óleos voláteis.....	25
3.2.Terpenoides	26
3.3. Monoterpenos	28
3.4 Sesquiterpenos	29
3.5 Diterpenos.....	30
3.6. Gênero <i>Salvia</i> L.....	31
3.6.1 Subgênero <i>Calosphace</i>	33
3.7. Fungos patogênicos oportunistas.....	36
4. MATERIAS E MÉTODOS	39
4.1 Material vegetal	39
4.2 Obtenção do óleo volátil	39
4.3 Análise química dos óleos voláteis.....	39
4.3.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada à detector de massas (CG-EM).....	39
4.3.2. Identificação dos componentes dos óleos voláteis.....	39
4.4. Exsudato	40
4.5. Avaliação da atividade antifúngica	40
4.5.1. Técnica de difusão em discos de papel (método de Kirby Bauer).....	40
4.5.2. Preparo das amostras para determinação do MIC	41
4.5.3. Preparo do inóculo fúngico.....	41
4.5.4. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis pelo método de microdiluição em placa	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Obtenção do óleo volátil	43
5.2. Composição química dos óleos essenciais de <i>Salvia procurrens</i> partes aéreas frescas.....	45
5.3. Caracterização química do óleo essencial de <i>Salvia procurrens</i> partes - aéreas secas.....	47

5.4. Caracterização química do óleo essencial de <i>Salvia ovalifolia</i> partes aéreas frescas.....	48
5.5. Caracterização química do óleo essencial de <i>S. uliginosa</i> partes aéreas frescas	50
5.6. Caracterização química do óleo essencial de <i>S. uliginosa</i> partes aéreas secas.	51
5.7. Exsudatos.....	52
5.8. Atividade anti- <i>Candida</i> do exsudato de <i>S. uliginosa</i> e o isolado Icetexona.....	58
5.9 Artigo publicado.....	59
6. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	653

1. INTRODUÇÃO

As descobertas científicas no campo dos fármacos desenvolvidos a partir do conhecimento popular tem provocado grande interesse de pesquisas a fim de promover a descoberta de novos produtos. Assim, o desenvolvimento sucessivo de novos fármacos trouxe de volta uma conhecida forma de combater infecções conhecidas e outras ainda sem tratamentos na sociedade moderna, ou seja, o uso de plantas medicinais (MENDES et al., 2020).

O estudo dos compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas é de extrema importância, pois representa uma “luz no fim do túnel” para o tratamento de doenças em que os fármacos existentes já não apresentam bons resultados na terapia (MOUMNI et al., 2020). Neste contexto, diversos estudos demonstraram que essas atividades estão diretamente ligadas aos óleos voláteis, que são líquidos oleosos com propriedades características de sabor e aroma (CUI et al., 2015). Esses metabólitos ganharam importância tanto para a indústria farmacêutica quanto para a de alimentos devido a uma série de atividades biológicas, como por exemplo, sua forte ação antioxidante e bactericida. Dentre as famílias de plantas produtoras de óleos voláteis encontra-se a Lamiaceae e, entre os gêneros aromáticos mais difundidos, encontram-se as espécies de *Salvia*, da Subfamília Nepetoideae, Tribo Menthae (FARHAT et al., 2013).

As espécies desse gênero destacam-se por apresentarem variáveis características morfológicas e químicas devido a sua grande distribuição nas cinco regiões do mundo: América Central e do Sul, Ásia Ocidental, Leste da Ásia, África e também na Europa (DIZKIRICI et al., 2015). Até então, foram catalogadas de 900 a 1000 espécies do gênero *Salvia* (Família Lamiaceae) (GIULIANI et al., 2017). No Brasil, este gênero compreende 68 espécies distribuídas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país. Diversas dessas espécies são amplamente usadas para os mais diversos fins já listados na literatura como problemas de pele, bucais, inflamatórios, de depressão, sudorese excessiva, entre outros (MENDES et al., 2020).

Entre suas aplicações medicinais observa-se a capacidade de ação antisséptica, anti-inflamatória e no tratamento de doenças psicológicas (FARHAT et al., 2013). Dentre as várias espécies do gênero, *Salvia officinalis* L. é a mais conhecida

e se naturalizou em diversas partes do mundo. Suas atividades medicinais são atribuídas a constituintes como terpenoides, entre eles 1,8-cineol, cânfora, borneol, α -tujona, β -tujona e viridiflorol. Diterpenos como carnosol e ácido carnósico, compostos fenólicos (como ácido rosmarínico), flavonoides e glicosídeos fenólicos também são relatados e considerados constituintes responsáveis pelas diversas aplicações e atividades farmacológicas (BRINDISI et al., 2021).

Com um elevado valor comercial e um grande número de espécies descritas na América do Sul (O'LEARY et al., 2016), os óleos voláteis destas plantas são uma alternativa muito interessante no tratamento de infecções onde existem resistência microbiana a medicamentos convencionais principalmente por apresentar uma baixa toxicidade em humanos (KOT et al., 2019).

As infecções fúngicas invasivas causam mais de 2.000.000 mortes a cada ano e as espécies do gênero *Candida* surgem como importantes patógenos oportunistas, causando centenas de infecções com risco de vida (YANG et al., 2022). *Candida albicans*, uma espécie muito frequente, habita lugares como pele, cavidade oral, mucosa do intestino e trato urogenital. Em condições de total homeostase do corpo é um fungo simbiótico. Porém, é considerado um dos principais patógenos fúngicos oportunista (LIU et al., 2017). Dentre suas características, a sua transformação entre hifa e levedura confere benefícios a sobrevivência do fungo e assim como a seus biofilmes, que são um grande problema aos atuais medicamentos e tratamentos (YANG et al., 2022).

Uma grande preocupação em meio à comunidade científica é em relação à resistência de microrganismos aos agentes antimicrobianos, uma vez que já existem espécies com múltipla resistência aos principais fármacos disponíveis no mercado, como é o caso da *Candida auris* (TCHERNOV et al., 2019; DAHIYA et al., 2020).

O atual arsenal medicamentoso anti *Candida* conta com um total de apenas cinco classes de compostos: polienos, alilaminas, azóis, fluopirimidinas e equinocandinas. Também é sabido que 80% dos antibióticos são derivados de compostos naturais (LIU et al., 2017), o que reforça ainda mais a necessidade de pesquisas de compostos originários de plantas.

Assim, a necessidade de desenvolvimento de novas substâncias com perfil antifúngico devido ao limitado conjunto terapêutico de combate a leveduras existente, o uso de plantas medicinais é uma excelente e conhecida fonte para o

desenvolvimento de novos fármacos, assim como uma boa opção para tratamentos associados a medicamentos já existentes devido seus inúmeros componentes químicos e atividades biológicas. Neste contexto, o presente trabalho visa o estudo dos óleos voláteis e exsudato de três espécies de *Salvia*, nativas da região sul do Brasil (*Salvia ovalifolia*, *Salvia procurrens* e *Salvia uliginosa*), objetivando a caracterização química e a investigação da atividade antifúngica frente a leveduras emergentes.

2. OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a importância da identificação de novas substâncias com atividade antifúngica e buscando alternativas terapêuticas efetivas, o presente trabalho propõe a caracterização química e a avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e exsudato obtidos das partes aéreas das espécies *Salvia ovalifolia*, *Salvia procurrens* e *Salvia uliginosa* encontradas no Rio Grande do Sul.

2.1 Objetivos Específicos

- Obtenção dos óleos voláteis por hidrodestilação a partir das folhas;
- Obtenção do exsudato utilizando extração com solvente;
- Caracterização da composição química dos óleos voláteis obtidos pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à detector de massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade antifúngica das amostras de óleo volátil e exsudatos pelo método de microdiluição em caldo segundo frente a espécies de *Candida*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Óleos voláteis

Óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são substâncias voláteis complexas presentes em plantas com características aromáticas. São líquidos ou semilíquidos, na maioria das vezes límpidos e, geralmente, de coloração amarelada. Presentes nas diversas partes das plantas como sementes, caules, cascas, brotos, flores, frutos e raízes. São conhecidos cerca de 3.000 óleos essenciais dos quais cerca de 300 são usados industrialmente (COX; MARKHAM, 2007; HOU et al., 2022).

Dados históricos relatam o uso do óleo de terebintina na Grécia e Roma, já a sua destilação como método de extração foi descrita em artigos do oriente médio em lugares como, Egito, Índia e Pérsia. Há relatos de uso medicinal dos óleos voláteis em farmácias na França, mas a partir dos séculos 19 e 20 sua aplicação se tornou mais voltada para uso de suas características de sabor e perfume (COX; MARKHAM, 2007).

A síntese dos óleos voláteis ocorre em todos os órgãos da planta a fim de protegê-la de possíveis agentes agressores, microrganismos em geral e herbívoros. No que diz respeito a seus constituintes estruturais comuns, estão presentes fenilpropanoides, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (NIETO, 2017).

São inúmeras as atividades biológicas atribuídas aos óleos voláteis, dentre elas, destacam-se as atividades antibacteriana (EVERTON et al., 2018), antifúngica (DIAS et al., 2019), antioxidante (TOLEDO et al., 2020) e anti-inflamatória (BRANDEMBURGO et al., 2020).

Atualmente, setores comerciais como o da indústria alimentícia têm demonstrado grande interesse nas características antioxidantes, alta reatividade e característica hidrofóbica (KRISHNAMOORTHY et al., 2021). Acredita-se que o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais esteja relacionado à sua natureza lipofílica, onde são capazes de provocar alterações nas membranas citoplasmática dos microrganismos, levando-a a sua instabilidade (TARIQ et al., 2019).

Sua atividade bactericida vem sendo estudada em formulações que levam óleos voláteis para combater doenças da cavidade oral. São importantes agentes

contra a formação de biofilme precursor de periodontites, carie dentária e gengivite, tanto em adultos como em crianças (DE OLIVEIRA CARVALHO et al., 2020).

Ainda, sobre a composição química das espécies de *Salvia*, estas podem apresentar diversos grupos de metabólitos secundários como, por exemplo, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, assim como compostos fenólicos, sacarídeos, entre eles ácido rosmarínico e ácido cafeico (STANKOVIĆ et al., 2020).

3.2. Terpenoides

O nome isopreno primordialmente foi dado aos hidrocarbonetos encontrados na terebintina. Isoprenos são considerados a família com maior número de compostos naturais, com mais de 30.000 diferentes estruturas e estão presentes em todos os reinos (Bacteria, Archaea e Eukaria), sendo sua maioria de origem vegetal. Por exemplo, só no tabaco há mais de 470 derivados isoprenoides. Praticamente todos os processos metabólicos presentes nas plantas precisam do envolvimento bioquímico ou fisiológico de um isoprenoide (BACH et al., 1995; LOMBARD; MOREIRA et al., 2011; LUDWICZUK et al., 2017).

Estruturalmente, os terpenos são considerados moléculas simples, compostas por hidrocarbonetos e caracterizados como uma combinação de unidade de isopreno (C₅), também chamado de hemiterpeno. São as unidades básicas formadoras de terpenoides como monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Sua síntese acontece no citoplasma celular das plantas a partir da acetil-CoA pela via do ácido mevalônico (HYLDGAARD et al., 2012; LUDWICZUK et al., 2017).

Através de várias condensações de dois modelos atuantes de isopreno, o isopentenil pirofosfato (IPP) e o dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que são as unidades formadoras dos terpenoides, os compostos vão sendo formados. O IPP e DMAPP podem ser metabolizados através de duas vias distintas e não dependentes, a via do mevalonato (MVA) e a do fosfato do metileritritol (MEP). A via MVA foi descoberta primeiramente na década de 50 em leveduras, e durante algum tempo acreditou ser a responsável pela formação de IPP, DMAPP e acetil-coenzima A (Acetil-CoA). A conhecida regra do isopreno que afirma que todos os terpenoides são formados de uniões do tipo cabeça-cauda é a mais comum, porém uniões do tipo não-cabeça-

cauda, também ocorrem (Figura 1) (MCGARVEY; CROTEAU et al., 1995; LOMBARD; MOREIRA et al., 2011; LUDWICZUK et al., 2017).

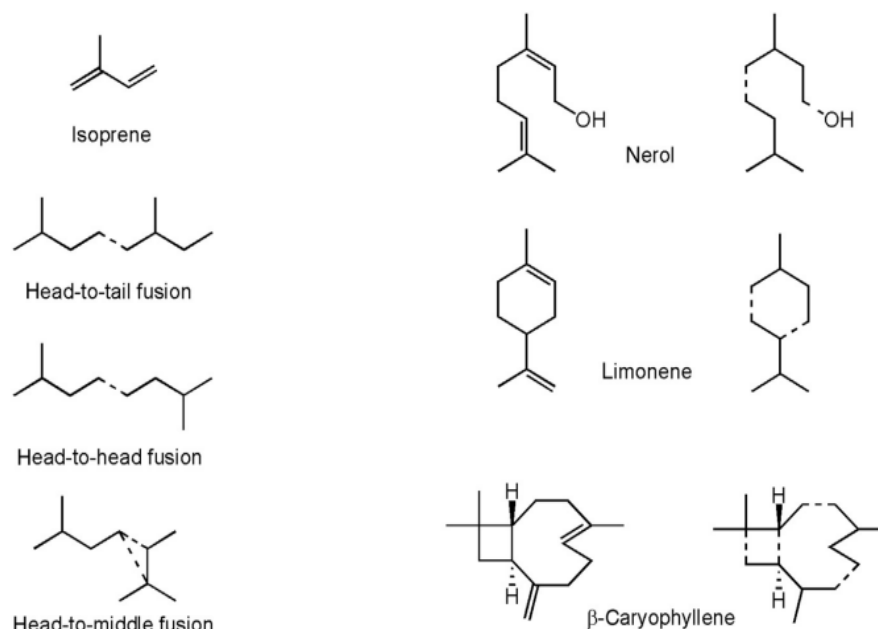


Figura 1: ligações do tipo cabeça-cauda e ligações não-cabeça-cauda (LUDWICZUK et al.,2017).

O IPP é formado no citosol através da já estabelecida rota do ácido mevalônico (MVA), que se inicia com a condensação de acetil-CoA e é o precursor do difosfato de farnesila (FPP), que forma sesquiterpenos e triterpenos. Já nos plastídios ocorre a forma ativa do IPP, o difosfato de dimetilalila (DMAPP), sendo formado a partir do piruvato e de gliceraldeídos-3-fosfato que na via do metileritritol fosfato (MEP) ou via do 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXP). Essa rota fornece então os precursores difosfato de geranila (GDP) e difosfato de geranylgeranila (GGDP), que posteriormente formam monoterpênos, diterpenos e triterpenos (Figura 2) (CHENG et al., 2007; MAFFEI et al., 2011).

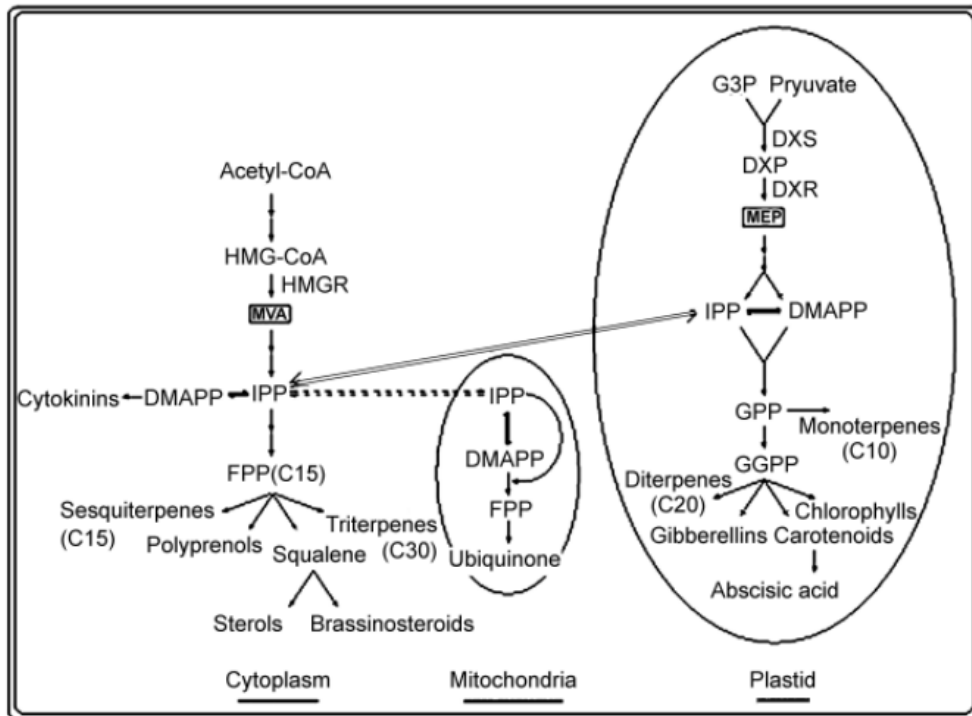


Figura 2: Rota biossintética dos terpenoides (CHENG et al., 2007).

3.3. Monoterpenos

Monoterpenoides apresentam um esqueleto de 10 carbonos ou duas unidades de isopreno ou difosfato de geranila (GPP), e podem ser divididos em grupos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e irregulares (SOUSA et al., 2022). Dentro de cada grupo se dividem em hidrocarbonetos insaturados simples e ou apresentando grupos funcionais como álcoois, aldeídos e cetonas (Figura 3). Ainda há diferença nas estruturas bicíclicas dos monoterpenos que diferem conforme o tamanho de seu anel (LUDWICZUK et al., 2017). São considerados os menores membros dessa classe de produtos naturais, como representantes temos o limoneno, mirceno, linalol, α - e β -pineno, entre vários outros (MAFFEI et al., 2011).

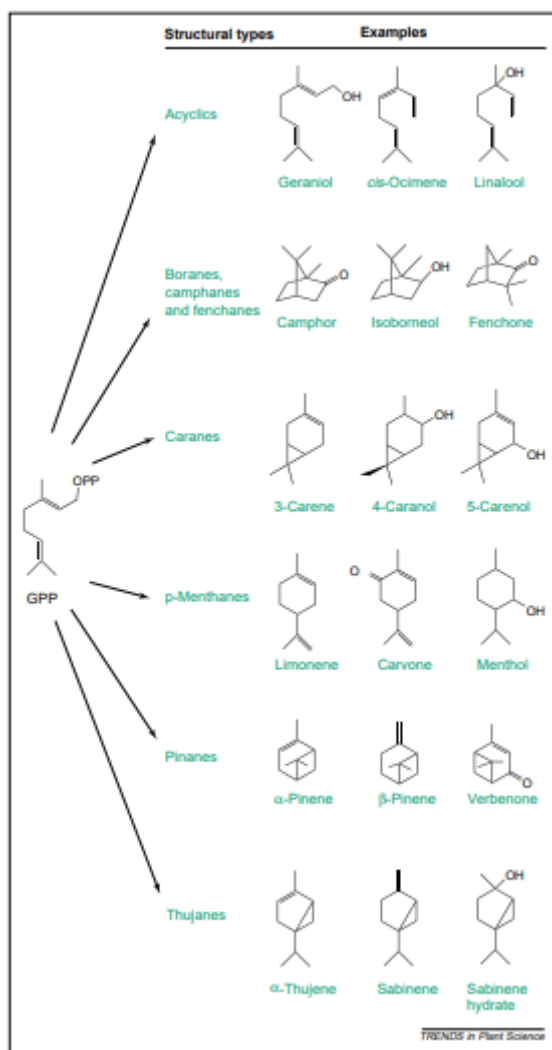


Figura 3: Exemplos estruturais de monoterpênicos (MAHMOUD; CROTEAU et al., 2002).

3.4 Sesquiterpenos

Sesquiterpenos (C₁₅) são formados no citosol celular das plantas e apresentam como precursor o pirofosfato de farnesila (FPP), que, por sua vez, é formado após condensação de DMAPP mais duas moléculas de IPP ou três unidades de isopreno (MCGARVEY; CROTEAU et al., 1995; PICHERSKY; DUDAREVA et al., 2006) ou três unidades de isopreno. Sua forma varia entre linear, monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos (LUDWICZUK et al., 2017). Na Figura 4 estão apresentados alguns exemplos de sesquiterpenos formados a partir do FPP.

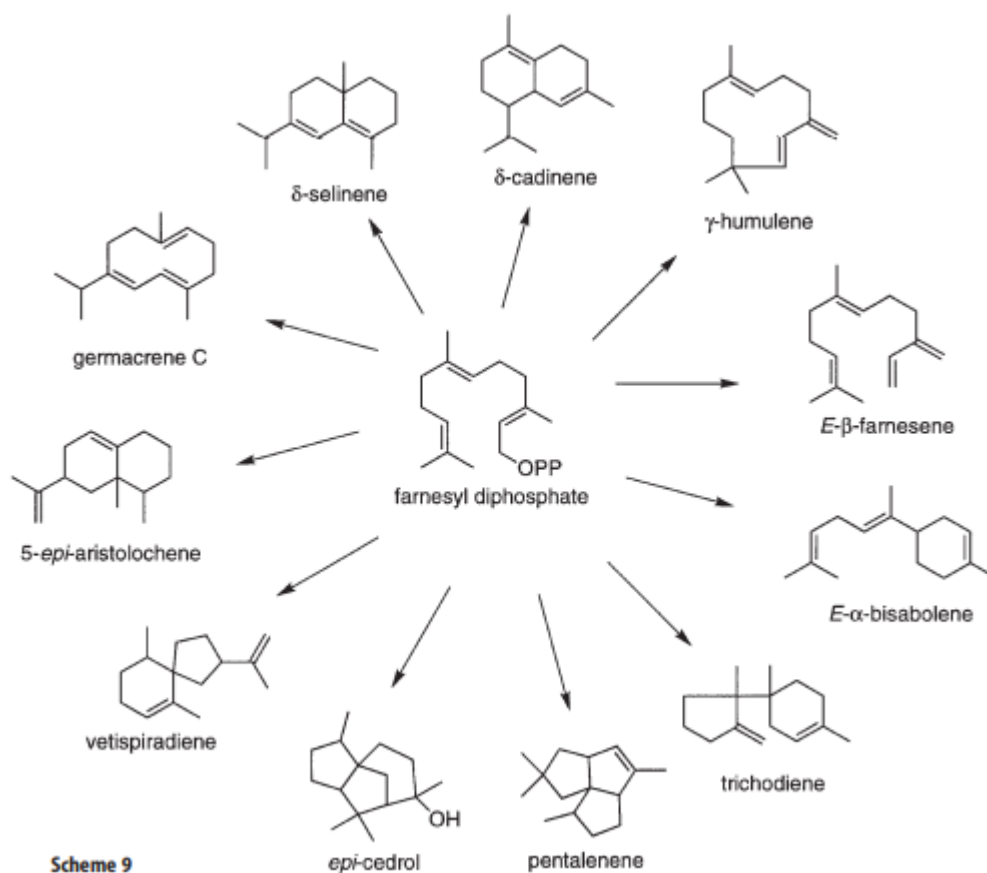


Figura 4: Exemplos estruturais de sesquiterpenoides (CROTEAU et al., 2003).

Nas plantas esses componentes apresentam propriedades que podem fornecer defesa contra microrganismos ou herbívoros, tendo também a função de sinalizadores químicos entre interações de plantas e insetos ajudando na polinização. Sua biossíntese pode ocorrer nas mais diversas partes da planta como caule, folhas, flores, raízes ou frutos (LICHTENTHALER et al., 1997). Alguns exemplos desses compostos são estruturas acíclicas como farnesol e β -nerolidol, monocíclicas como β -bisaboleno, α -zingibereno e α -humuleno e também bicíclicas como β -santaleno, β -cariofileno e δ -cadineno (LUDWICZUK et al., 2017).

3.5 Diterpenos

Os diterpenos têm como precursor o isoprenoide difosfato de geranylgeranila (GGPP) que se forma após rearranjos e ligações do tipo cabeça-cauda entre quatro

unidades de isopreno. São naturalmente moléculas mais pesadas e são caracterizadas por exigir um tempo maior no processo de destilação e obtenção de sua porção de óleos voláteis (BAŞER; DEMIRCI et al., 2007).

Constituem um grupo quimicamente diverso e podem ser classificados como lineares, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos ou macrocíclicos (Figura 5) (LUDWICZUK et al., 2017).

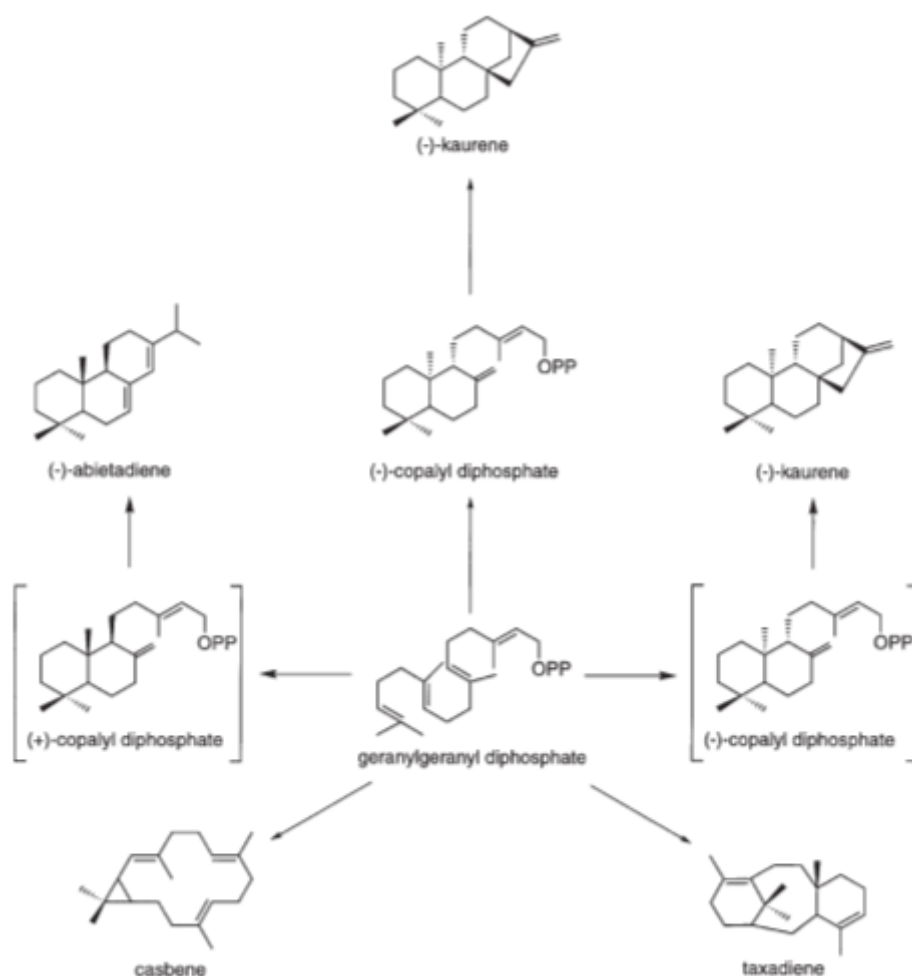


Figura 5: Exemplos de diterpenoides (CROTEAU et al., 2003).

Como exemplo de diterpenos acíclicos: geraniol, citronelol; cíclico: canfeno e mirceno; bicíclico: sclareol, manool, labdano, abienol e os tricíclicos: kaur-15-ene, kaur-16-ene e filocladeno (BAŞER; DEMIRCI et al., 2007).

3.6. Gênero *Salvia* L.

A família Lamiaceae compreende uma grande variedade de plantas composta por mais de 256 gêneros e 7.000 espécies aproximadamente, com conhecidas propriedades de uso medicinal e com características aromáticas, também conhecidas como especiarias. Alguns exemplos de plantas dessa família são: *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Mentha x piperita* conhecidas e usadas na medicina tradicional, usadas como chás, tinturas, gargarejos, xaropes ou enxaguatórios bucais, podem ser classificadas pela presença de dois compostos o ácido rosmarínico (Nepetoideae) ou iridoides (Lamioideae) geralmente com maior quantidade de óleo encontrada nos representantes da subfamília Nepetoideae (BEKUT et al., 2018; PANDEY et al., 2014).

O gênero *Salvia*, é o maior da família Lamiaceae, com cerca de 900 espécies (GHORBANI e ESMAEILIZADEH, 2017). Seu uso como condimento alimentar além de suas propriedades farmacológicas (*Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa* e *Salvia pomifera*) é datado desde períodos históricos como a era grega (POULIOS; GIAGINES e VASIOS, 2020). A espécie mais expressiva é *Salvia officinalis*, nativa do oriente no mediterrâneo. Essa espécie tem, hoje, seu cultivo difundido pelo mundo inteiro. Caracterizada como um subarbusto perene, apresenta caule amadeirado, folhas acinzentadas e flores azuis arroxeadas, cálice e corola dividida em dois lábios (GHORBANI e ESMAEILIZADEH, 2017; POULIOS; GIAGINES e VASIOS, 2020).

Estudos recentes atribuem propriedades farmacológicas de grande importância a *Salvia officinalis* como anticarcinogênico, anti-inflamatório, hipoglicêmico, hipolipidêmico, anti-demência, antimicrobiano, antimutagênico e antinociceptivo (GHORBANI e ESMAEILIZADEH, 2017; POULIOS; GIAGINES e VASIOS, 2020).

A atividade antifúngica do óleo essencial de *Salvia officinalis* está relacionada à presença de alguns componentes químicos como *cis*-tujona, β -pineno, 1,8-cineol e α -humuleno (NUZHAT e VIDYASAGAR, 2013). Além disso, o óleo volátil desta espécie demonstrou uma importante atividade antioxidante, podendo ser utilizado como alternativa a conservantes artificiais (PORTE; GODOY e MAIA-PORTE, 2013).

Em relação a atividade anti-inflamatória, Tosun e colaboradores (2014), em seu estudo, avaliaram a ação do óleo essencial (OE) de *Salvia officinalis* sobre a supressão da produção de óxido nítrico (ON), um importante mediador pró-inflamatório e responsável pelas diversas respostas inflamatórias. Os autores observaram que o OE inibiu significativamente a produção de ON produzido nas células em estudo, indicando uma interessante ação anti-inflamatória.

Sobre a utilização do óleo essencial de *Salvia*, existem estudos onde são avaliados como enxaguatórios bucais, sendo capazes de melhorar condições inflamatórias em afecções de boca e garganta, além de ser indicado como carminativo, digestivo e aperitivo. Também muito utilizado na aromaterapia, esses óleos podem melhorar as dores musculares e as contrações do parto, ajudando também a reduzir as dismenorreias e amenorreias, além de ser muito eficaz nas condições de depressão pós-parto e problemas que envolvem o útero. Seu uso é considerado seguro, pois é atóxico, não sensibilizante e não irritante (MAHBOUBI, 2020).

3.6.1 Subgênero *Calosphace*

Subgênero encontrado desde as planícies dos Estados Unidos até o sul da América do Sul, com distribuição em quatro regiões de grande concentração que são: México, onde é encontrado uma maior variedade com aproximadamente 275 espécies, Cordilheira dos Andes, com 155 espécies, leste da América do Sul com 60 espécies e Antilhas do Caribe com 45 espécies. Existem evidências sugerindo o México como o berço desse subgênero (JENKS; WALKER et al., 2013).

Salvia procurrens pertencente ao subgênero *Calosphace*, de clado *Uliginosae*. Um subarbusto que pode chegar a até 65 cm de altura, rasteira, possui folhas com base cordada, característica oval a suborbicular e ápice arredondado. Flores que podem ser azul escuro ou azul claro (Figura 6) (BURKART, 1948; ALBERTO et al., 2003; JENKS; WALKER et al., 2013).



Figura 6. *Salvia procurrens*, foto - Sergio Bordignon.

Salvia uliginosa subgênero *Calospace*, também pertencente ao clado *Uliginosae* possui características de arbusto ou subarbusto podendo medir até 200 cm de altura, com folhas lanceoladas. Suas flores apresentam coloração branca e azul. Ocupam áreas como sul do Brasil, Uruguai e nordeste e centro da Argentina (Figura 7) (BURKART, 1948; ALBERTO et al., 2003; JENKS; WALKER et al., 2013).



Figura 7. *Salvia uliginosa*, foto - Sergio Bordignon.

Por causa de suas belas flores e também devido a sua capacidade de adaptação a fatores como solo e luminosidade, essa planta também se tornou comum em jardins da Europa. Na medicina popular é comumente usada devido seus efeitos carminativos, tônico e estimulante (GIULIANI, 2017).

Salvia ovalifolia um subarbusto que ocorre em países como Brasil (mais específico na região sul), Paraguai, Argentina e Uruguai. Essa espécie apresenta folhas sésseis a subsésseis com lâminas largas e ovais, flores que podem ter coloração branca, azul, lilás ou violeta (Figura 8) (BURKART, 1948). Também pertencente ao clado Uliginosae as espécies *S. uliginosa* e *S. procurrens*. O trabalho de JENKS e colaboradores que, ao observar as diferenças de filogenia, indica que existe uma ligação simpátrica entre as três espécies e que *S. ovalifolia* portanto considerando um híbrido inespecífico (JENKS; WALKER et al., 2013).



Figura 8. *Salvia ovalifolia*, foto - Sergio Bordignon.

Segundo Pinto (2012), os óleos essenciais obtidos de *S. uliginosa* e *S. procurrens* possuem cores que vão do laranja ao avermelhado sugerindo a presença de diterpenos, e sua composição química apresentou componentes majoritários como o ácido hexadecanoico, nonadecanal e *n*-nonadecanal. Neste mesmo estudo, os óleos essenciais obtidos das duas plantas mostraram atividade frente a *Staphyococcus aureus*. No óleo essencial de *S. ovalifolia* foram detectados 28 compostos; entre os majoritários está nonadecanal.

3.7. Fungos patogênicos oportunistas

Fungos patogênicos estão surgindo como importantes ameaças à saúde global. Esses patógenos são responsáveis por uma série de doenças, com prevalência e resultados clínicos variáveis (GEDDES e SHAPIRO, 2019). O aumento da incidência de infecções por *Candida* spp., por exemplo, tem aumentado a morbimortalidade na população, particularmente entre pacientes gravemente imunocomprometidos e

aqueles com longa permanência em hospitais. A super utilização de antibióticos de amplo espectro complicou ainda mais o cenário, levando ao surgimento de cepas de *Candida* resistentes, especialmente não-*albicans* (SRIVASTAVA; SINGULARES E DUBEY, 2018). Com a preocupante resistência de leveduras consideradas emergentes aos agentes antifúngicos, a busca por novas substâncias capazes de inibir o crescimento fúngico é de grande importância.

Medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais são amplamente utilizados para tratar uma grande diversidade de doenças e seu uso vem ocorrendo no mundo todo (DE MACEDO et al., 2020). Metabólitos secundários de plantas são a base para a descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, devido suas inúmeras atividades farmacológicas (KAYSER, 2018). Muitas vezes, essas atividades farmacológicas estão diretamente ligadas aos óleos essenciais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Os exemplares das espécies foram coletados em diferentes municípios do estado do Rio Grande do Sul e identificadas pelo botânico Dr. Sérgio L. Bordignon. Uma exsicata de cada planta foi depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICN.

4.2 Obtenção do óleo volátil

O óleo volátil foi obtido a partir das partes aéreas frescas e secas. As folhas frescas foram mantidas em refrigerador e as secas foram anteriormente colocadas para secar em ambiente arejado ao abrigo de luz e, após, foram reduzidas com auxílio de um triturador mecânico de facas e submetido à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, durante 4 horas (Farmacopeia Brasileira, 2019). Posteriormente, os óleos foram coletados e armazenados sob refrigeração, em frascos do tipo vidro âmbar até a análise dos constituintes.

4.3 Análise química dos óleos voláteis

4.3.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada à detector de massas (CG-EM)

Para a análise química, os óleos voláteis obtidos por hidrodestilação foram diluídos em éter etílico na razão de 2:100 (v/v). As análises qualitativa e quantitativa foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (CG-MS), modelo Shimadzu QP5000, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Durabond-DB-5 (30 m x 0,25 x mm x 0,25 µm) para separação dos constituintes. A temperatura do injetor e detector foi de 220 °C e 250 °C, respectivamente, e a temperatura da coluna foi programada com rampa de aquecimento de 60 °C a 300 °C com variação de 3 °C/min. Hélio foi usado como gás carreador a 80 kPa e fluxo de 1 mL/min (tempo total de análise foi de 80 min).

4.3.2. Identificação dos componentes dos óleos voláteis

A identificação dos componentes dos óleos foi baseada na comparação entre seu índice de retenção, calculado por interpolação linear relativa para o tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos, e seu espectro de massas, com amostras autênticas e dados retirados da literatura (ADAMS, 2017) bem como, por comparação com espectros de massas registrados em espectroteca de aquisição (NIST 62 e NIST 12 - National Institute of Standards and Technology).

4.4. Exsudato

A extração dos constituintes foi realizada através da imersão das folhas intactas de *Salvia procurrens* (10,60 g) e *Salvia uliginosa* (10,70 g) por 30 segundos em diclorometano cobrindo totalmente o material. Posteriormente, os líquidos de coloração vermelha foram filtrados e em seguida concentrados em evaporador rotatório (temperatura inferior a 45 °C). Após a evaporação, as amostras foram armazenadas.

4.5. Avaliação da atividade antifúngica

Na investigação da atividade antifúngica, as amostras de exsudato foram submetidas, inicialmente, a técnica de difusão em disco de papel para tentar prever a existência de possível atividade. Em caso positivo, as amostras foram submetidas, na sequência, a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As amostras de óleo volátil foram submetidas diretamente ao ensaio da determinação da CIM por causa da pouca quantidade de amostra disponível.

A atividade antifúngica foi testada frente a fungos leveduriformes das espécies *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, depositadas na Micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da (UFRGS).

4.5.1. Técnica de difusão em discos de papel (método de Kirby Bauer)

O teste foi realizado em placas de Petry estéreis contendo ágar Sabouraud. Resumidamente, uma suspensão em ágar Sabouraud da levedura (90%) foi

espalhada sobre o ágar da placa. Discos de papel foram impregnados com 15 µg de cada amostra de exsudato dissolvido em diclorometano (foi assegurada a evaporação completa do diclorometano) e colocados na superfície do meio previamente inoculado. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C e a leitura dos halos de inibição foram realizadas após 48h. A escala de medição foi a seguinte: a zona de inibição > 15 mm foi considerada fortemente inibitória; a zona de inibição 10-15 mm moderadamente inibitória e < 10 mm não inibitória (CAROVIĆ-STANKO et al., 2010). O teste foi realizado em duplicata. Os exsudatos que exibiram forte inibição foram submetidos ao ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Como controle positivo foi utilizado disco de fluconazol e como controle negativo foi utilizado disco de papel impregnado com diclorometano (e evaporado) para verificar possível ação.

4.5.2. Preparo das amostras para determinação do MIC

Os exsudatos de *S. procurrens* e da *S. uliginosa* e o isolado *icetexona* (previamente obtido destas espécies e fornecido pelo laboratório 504, da Faculdade de Farmácia) foram pesadas em balança de precisão Mettler Toledo, modelo AB 204. Estas foram dissolvidas em salina com auxílio de dimetil sulfóxido - DMSO (Nuclear®) para preparar uma solução 1000 µg/mL para a determinação do MIC.

4.5.3. Preparo do inóculo fúngico

Tomou-se como referencial, o método de microdiluição, segundo as recomendações do Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI, 2008). Foram seguidos os protocolos de preparação do inóculo fúngico de acordo com o documento M27-S4 para fungos leveduriformes.

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 35 °C por 24 horas. Primeiramente tocou-se com a alça microbiológica na superfície da colônia fúngica e suspendeu-se em solução salina 0,85% estéril. A suspensão fúngica foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm. A transmitância da suspensão correspondeu à escala de 0,5 de Macfarland (1×10^6 células/mL). A partir dessa solução fúngica, foi realizada uma diluição 1:50 em salina estéril. A partir da solução 1:50, é feita a diluição 1:20 em caldo RPMI 1640, obtendo-

se um inóculo com 1×10^3 a 5×10^3 células/mL. Este último foi o inóculo utilizado para o ensaio de suscetibilidade.

As leituras dos inóculos foram realizadas em espectrofotômetro Femto, modelo 600 Plus e a homogeneização dessas amostras no meio foi através de vórtex IKA, modelo Lab Dancer.

4.5.4. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis pelo método de microdiluição em placa

O teste de susceptibilidade aos óleos voláteis foi realizado pelo método de microdiluição em placa, em concentrações de 2 a 512 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com as recomendações dos documentos aprovados pelo Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI, 2008), e os resultados expressos em concentração inibitória mínima (CIM). Os ensaios foram desenvolvidos em triplicata, sendo realizados, portanto, três experimentos para cada cepa estudada. As microplacas foram incubadas a 35 °C durante 48 horas em estufa e a leitura para determinação da CIM do óleo essencial foi realizada em 24 e 48 horas pelo método visual, comparando com os controles do teste, sendo um controle positivo do meio (RPMI 1640) e o outro o controle do diluente da amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do óleo volátil

As três espécies de *Salvia*, *S. ovalifolia*, *S. uliginosa*, *S. procurrens* foram coletadas e armazenadas no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), para posterior extração do óleo volátil em aparelho do tipo Clevenger por hidrodestilação (Figura 9). Os dados de coleta estão apresentados na Tabela 1. Partes aéreas foram coletadas e pesadas. Optou-se por analisar se haveria diferença entre óleos de plantas frescas e secas. O processo de secagem das plantas foi feito ao abrigo de luz e em temperatura ambiente, as porções frescas foram armazenadas em refrigerador, posteriormente foi pesado 100 g de cada amostra, todas as amostras tiveram tempo de extração de 4 horas cada.



Figura 9: Partes aéreas das salvias usadas para a extração no aparelho Clevenger: imagem 1 *S. uliginosa* fresca; 4 *S. uliginosa* seca. 2 e 3 *S. ovalifolia* frescas. 5 *S. procurrens* fresca; 6 *S. procurrens* seca.

Tabela 1. Dados de coleta das três espécies de *Salvia* encontrados no Rio Grande do Sul.

Nome da espécie	Município de coleta	Data da coleta
<i>S. procurrens</i>	Passa sete	Setembro de 2020
<i>S. ovalifolia</i>	Barão do Triunfo	Outubro de 2021
<i>S. uliginosa</i>	Segredo	Setembro de 2020

Sobre os óleos essenciais, após as 4 horas de extração não foi possível obter um bom rendimento sendo obtidos apenas traços de óleo. Sobre as características dos óleos voláteis, logo nas primeiras horas é possível observar a coloração laranja avermelhada em *S. procurrens* e *S. uliginosa* (Figura 10). *S. ovalifolia* apresentou o óleo mais claro. Os óleos obtidos não apresentaram aroma.

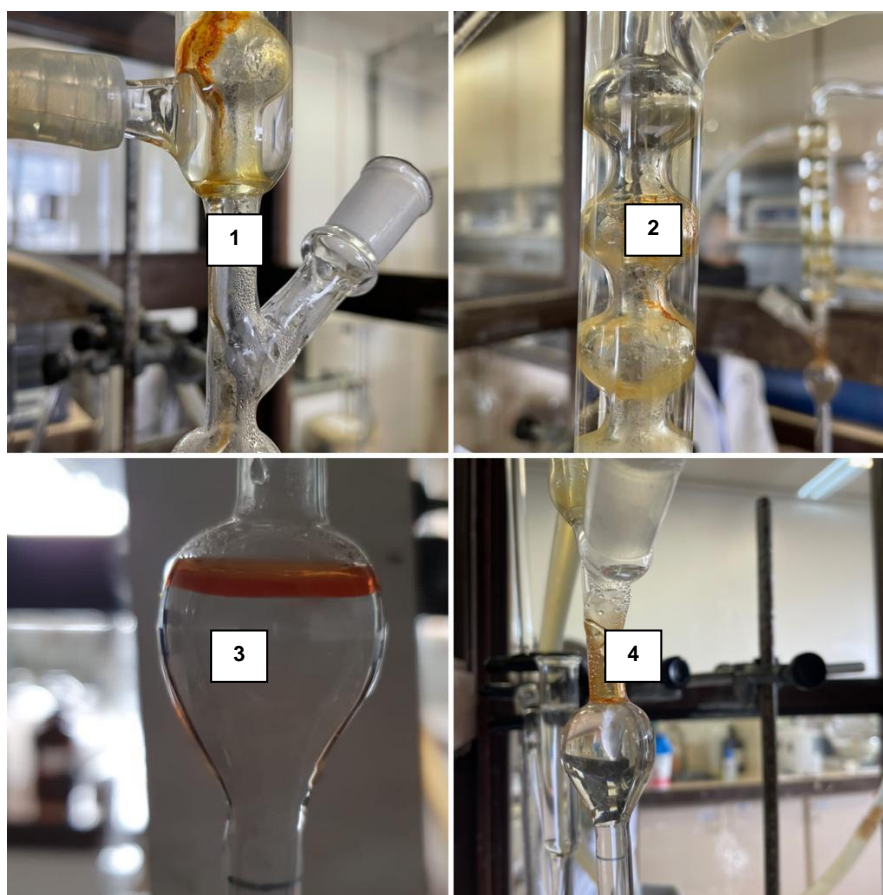


Figura 10. Concentrados de óleos essenciais vistos já nas primeiras horas de extração. 1 e 3: *S. procurrens*; 2 e 4: *S. uliginosa*.

As amostras foram divididas em *S. procurrens* seca e fresca, *S. uliginosa* seca e fresca e *S. ovalifolia* fresca. Devido a problemas, não conseguimos material suficiente para produzir o material seco de *S. ovalifolia* (Figura 11).

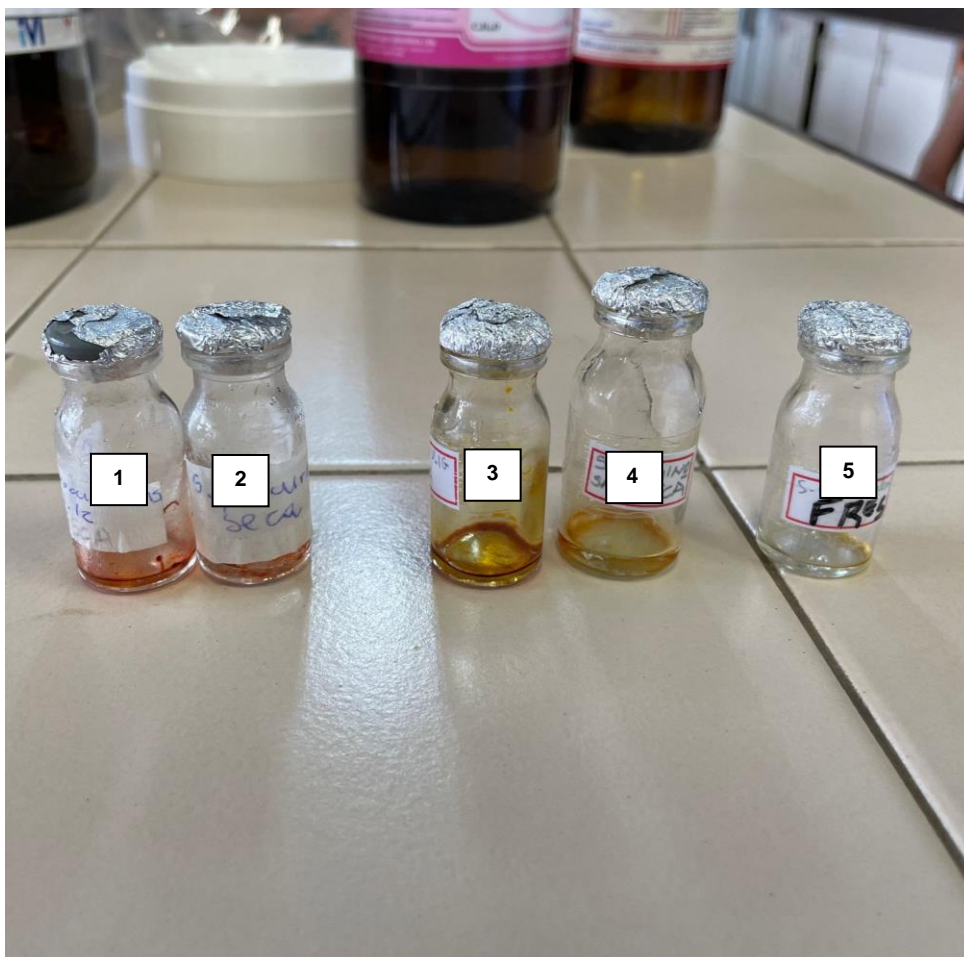


Figura 11: Da esquerda para a direita: 1 *S. procurrens* fresca; 2 *S. procurrens* seca, 3 *S. uliginosa* fresca; *S. uliginosa* seca, *S. ovalifolia* fresca.

5.2. Composição química dos óleos essenciais de *Salvia procurrens* partes aéreas frescas

Esse óleo apresentou cor avermelhada, sem presença de essência. Não foi possível medir o volume, pois apenas traços do óleo foi obtido. O cromatograma do óleo extraído de *S. procurrens* obtido por CG-EM está apresentado na (Figura 12), e os compostos estão sumarizados na Tabela 2. Foram detectados 10 compostos para este óleo. O composto majoritário (37,7%) foi caracterizado como um hidrocarboneto alifático, mas não pode ser identificado.

Em segundo lugar está o ácido hexadecanoico (25,3%) (1) seguido do nonadecanal (19,9%) (2). Pinto (2012) em sua pesquisa encontrou como um dos componentes majoritários no óleo essencial de *S. procurrens* o composto nonadecanal na concentração de 13,18%.

Fatores externos podem contribuir para o aumento ou diminuição da concentração desses compostos nas plantas.

O estudo de SANGWAN e colaboradores (2001), apontou que diversos fatores, entre eles pressão atmosférica e as precipitações, influenciam na composição do óleo volátil de plantas aromáticas. Em *Salvia officinalis*, notou-se que o rendimento e composição foi maior nos períodos de chuva.

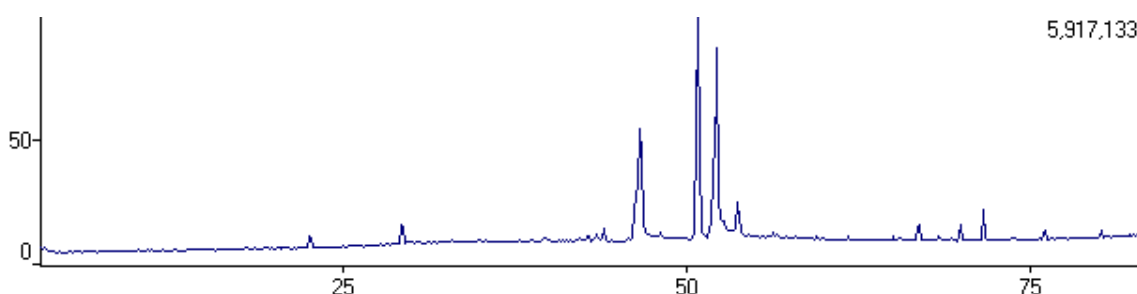


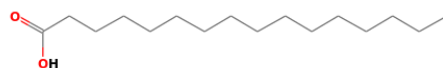
Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de *S. procurrens* partes aéreas frescas obtidas por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG-EM).

Tabela 2. Composição percentual do óleo essencial de *S. procurrens*, obtido de partes aéreas frescas.

Nº do Pico	IR*	Componentes	%
1	1978	Ácido hexadecanoico	25,3
2	2102	NI	10,4
3	2111	Nonadecanal	19,9
4	2155	NI	37,7
5	2167	NI	1,5
6	2170	NI	2,0
7	2658	Hexacosano	1,1
8	2854	Octacosano	1,9

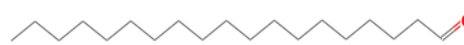
IR*- Índice de Retenção em coluna DB-5; NI- Não identificado.

Ácido hexadecanoico



1

Nonadecanal



2

5.3. Caracterização química do óleo essencial de *Salvia procurrens* partes - aéreas secas

Foram obtidos traços desse óleo, não sendo possível calcular seu rendimento. Pela análise por CG/EM (Figura 13) foi possível caracterizar o óleo extraído. A composição química junto com seu índice de retenção e porcentagem estão sumarizados na Tabela 3. Foram identificados três compostos: ácido hexadecanoico (44,5%), nonadecanal (41,9%) e o terceiro composto caracterizado como apresentando ligação tripla (13,7%), mas que não foi identificado.

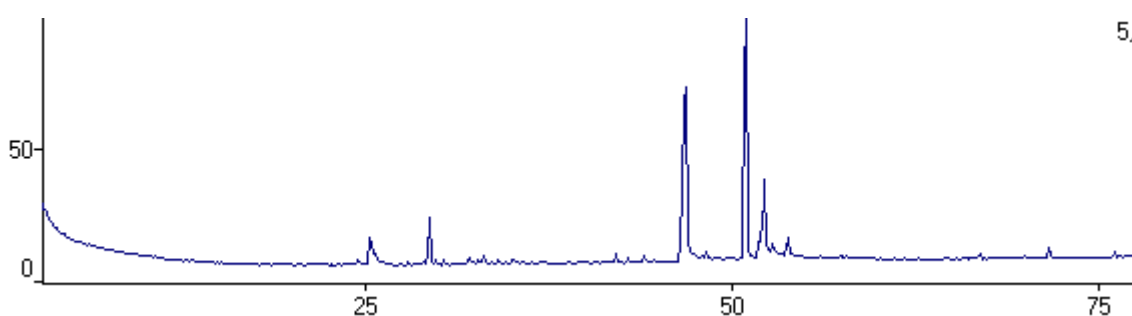


Figura 13. Cromatograma do óleo essencial de *S. procurrens* partes aéreas secas obtidas por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Tabela 3. Composição percentual do óleo essencial de *S. procurrens* partes aéreas secas.

Nº do Pico	IR*	Componentes	%
1	1984	Ácido hexadecanoico	44,47

2	2112	Nonadecanal	41,87
3	2154	NI	13,66

IR*- Índice de Retenção obtido em coluna DB-5; NI- Não identificado.

Comparado com o óleo essencial de *S. procurrens* partes aéreas frescas, observou-se que apesar de menor quantidade de compostos, o óleo essencial de *S. procurrens* partes aéreas secas mostrou uma concentração ainda maior dos compostos. Em estudo com *Salvia verbenacea*, muito usada para tratar problemas de cálculos renais e coletada na Sicília, Itália, também foi observada presença em grande quantidade de ácido decanoico (23,1%), principal composto do óleo. Esse mesmo óleo exibiu excelente atividade frente a bactérias Gram positivas (CANZONERI et al., 2011).

No estudo realizado por Pinto (2012) o composto majoritário obtido do óleo essencial das partes aéreas de *S. procurrens* foi o composto nonadecanal, representando 13,18% do conteúdo de óleo obtido.

5.4. Caracterização química do óleo essencial de *Salvia ovalifolia* partes aéreas frescas

O óleo obtido de *S. ovalifolia* mostrou ter características mais distintas, apresentando uma coloração mais clara e límpida. Não foi possível calcular o rendimento, pois a quantidade de óleo obtido foi muito baixa. O cromatograma do óleo essencial obtido por CG/EM está apresentado na Figura 14 e a caracterização química do óleo está demonstrada na Tabela 4. Foram detectados 8 compostos; sendo que o composto majoritário (45,8%) não foi possível identificá-lo. Alfa-bisabolol 17,3%, ácido hexadecanoico 12,0% e nonadecanal 11,3% também foram observados em quantidades expressivas.

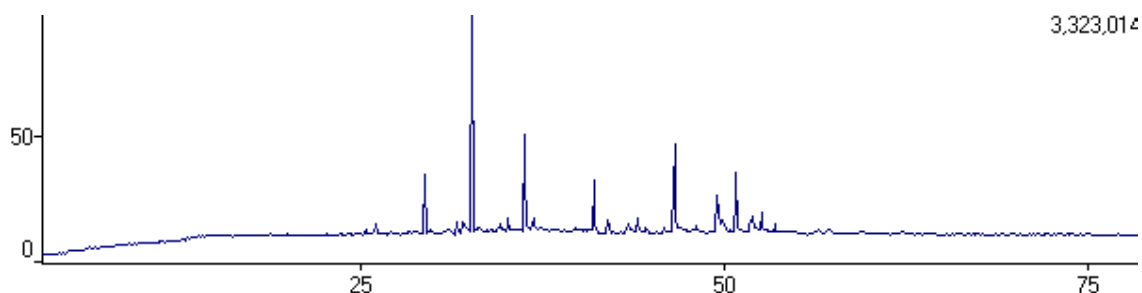


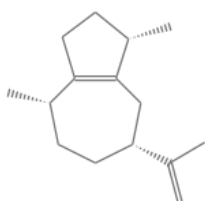
Figura 14. Cromatograma do óleo essencial de *S. ovalifolia* partes aéreas frescas obtidas por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Tabela 4. Composição percentual do óleo essencial de *S. ovalifolia* obtidas das partes aéreas frescas.

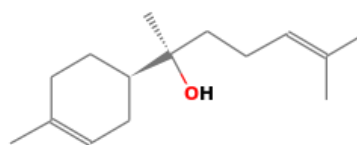
Nº do Pico	IR*	Componentes	%
1	1422	Alfa-guaieno	TR
2	1585	NI	45,8
3	1681	Alfa-bisabolol	17,3
5	1812	NI	9,7
6	1978	Ácido hexadecanoico	12,0
7	2070	NI	3,9
8	2111	Nonadecanal	11,3

IR*- Índice de Retenção em coluna DB-5; NI- Não identificado; TR- traços.

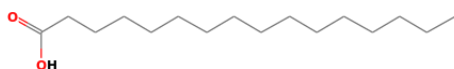
α -Guaiene



α -Bisabolol



Ácido hexadecanoico



Nonadecanal



Fonte: Imagens de Nist.

A amostra coletada no município de Barão do Triunfo no período de outubro de 2021 apresentou variedade em sesquiterpenos e ácidos graxos, levando em consideração que diversos fatores, tais como o clima solo, chuva, etc., podem interferir nos resultados dos óleos obtidos. O óleo ainda apresentou resultados parecidos com os das amostras de *S. ovalifolia* (14,0% e 56,7%) coletadas por Pinto (2012) em Caçapava do Sul e em São Francisco de Paula, respectivamente.

α -Bisabolol é um sesquiterpeno que foi descoberto pela primeira vez em 1951, bastante usado na indústria farmacêutica em formulações cosméticas e

dermatológicas. Esse terpenoide possui propriedades anti-inflamatórias, anti-irritantes, antibacterianas e não alergênicas (KAMATOU; VILJOEN et al., 2010).

5.5. Caracterização química do óleo essencial de *S. uliginosa* partes aéreas frescas

Foram obtidos apenas traços do óleo, que apresentou cor laranja-avermelhada assim como relatado no estudo de Pinto (2012). A composição química do óleo extraído junto a sua composição, e seus índices de retenção e porcentagem para os componentes identificados através do método de CG/EM (Figura 15) estão sumarizados e expostos na Tabela 5. Os compostos majoritários encontrados identificados foram nonadecanal (40,2%) e heptadecanona (25,6%) e o composto não identificado com 14,45%. Ácido hexadecanoico apareceu apenas traços.

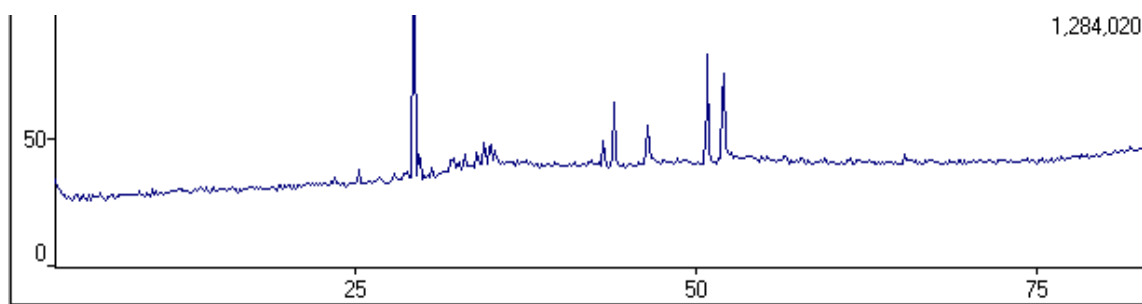
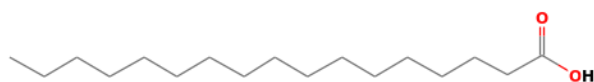


Figura 15. Cromatograma do óleo essencial de *S. uliginosa* partes aéreas frescas obtidas por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM).

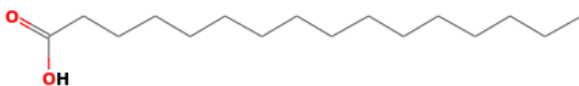
Tabela 5. Composição química do óleo essencial das partes aéreas frescas de *S. uliginosa*.

Nº do Pico	IR*	Componentes	%
1	1590	NI	14,45
2	1776	NI	3,40
3	1898	NI	5,47
5	1899	Heptadecanona	25,60
6	1902	NI	4,28
7	1974	Ácido hexadecanóico	TR
8	2111	Nonadecanal	40,22

IR*- Índice de Retenção; NI- Não identificado; TR- traços.



Heptadecanona



Ácido hexadecanoico



Nonadecanal

Fazendo uma comparação com as espécies estudadas por Pinto (2012) em que suas amostras foram coletadas no município de Júlio de Castilhos-RS no período de outubro de 2010 a junho de 2011, o ácido hexadecanoico apresentou teor de 22,2%, sendo o componente majoritário na amostra, seguido de nonadecanal 13,2%.

5.6. Caracterização química do óleo essencial de *S. uliginosa* partes aéreas secas.

O óleo de *S. uliginosa* seca apresentou característica de cor igual a *S. uliginosa* fresca, porém um único pico detectado. A composição química do óleo extraído por CG/EM (Figura 16) junto a seu único composto identificado, índice de retenção e porcentagem está exposto na Tabela 6. Foi identificado nonadecanal como composto majoritário.

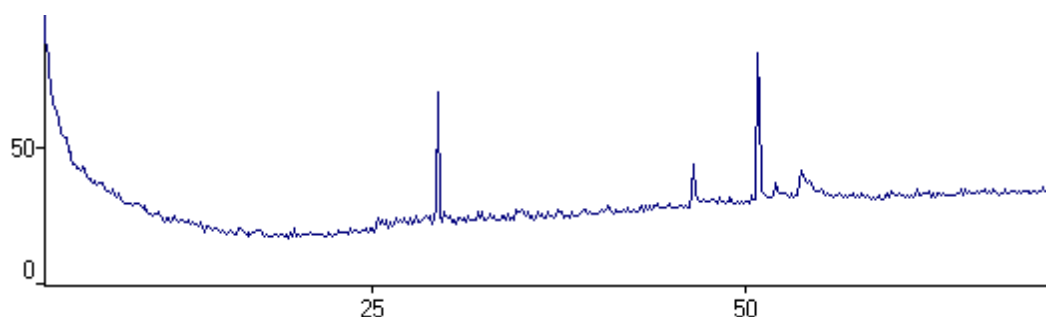


Figura 16. Cromatograma do óleo essencial de *S. uliginosa* partes aéreas frescas obtidas por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Tabela 6. Composição química do óleo essencial das partes aéreas secas de *S. uliginosa*.

Nº do Pico	IR*	Componentes	%
1	2113	Nonadecanal	70

IR*- Índice de Retenção em coluna DB-5.

As amostras estudadas foram ricas em ácidos graxos e compostos como o nonadecanal presente na maioria das espécies estudadas seguido do ácido heptadecanoico, esses achados podem indicar uma possível característica das espécies de *Salvia* encontradas no Rio Grande do Sul. Os mesmos dados estão de acordo com os achados feitos por Pinto (2012), estudo em que analisa as mesmas espécies aqui estudadas.

5.7. Exsudatos

Os exsudatos de *S. uliginosa* e *S. procurrens*, previamente analisados por Cezarotto (2018) e ricos em diterpenos, foram usados para então buscar atividade antifúngica contra cepas selecionadas de *Candida*. Foram pesados 10 g de cada planta (Figuras 17 e 18). Após a imersão total por 30 segundos em diclorometano, os exsudatos foram filtrados (Figura 19).

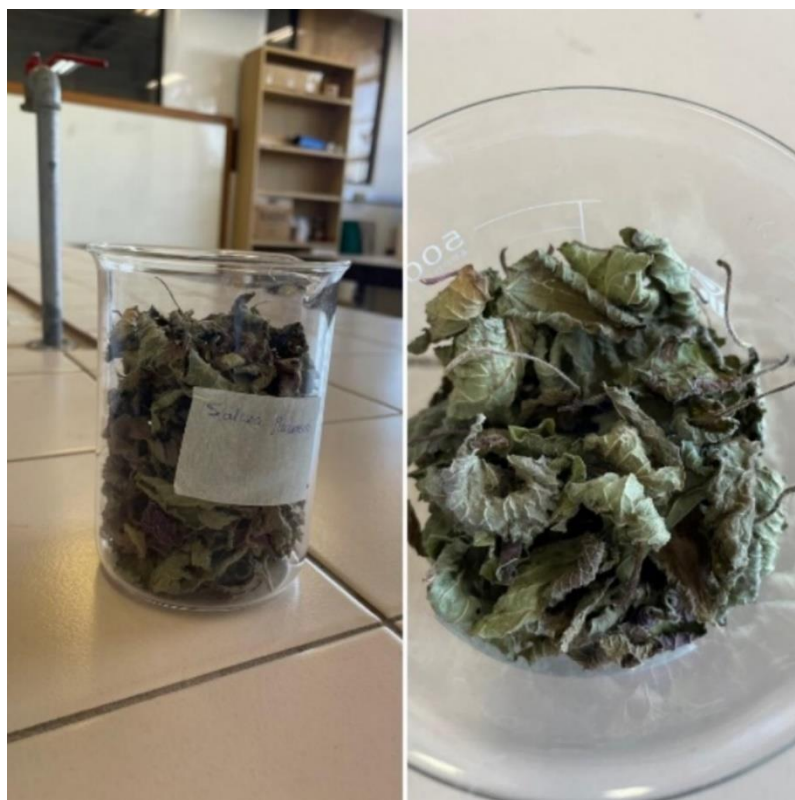


Figura 17. *Salvia procurrens* ressecada usada para o exsudato.

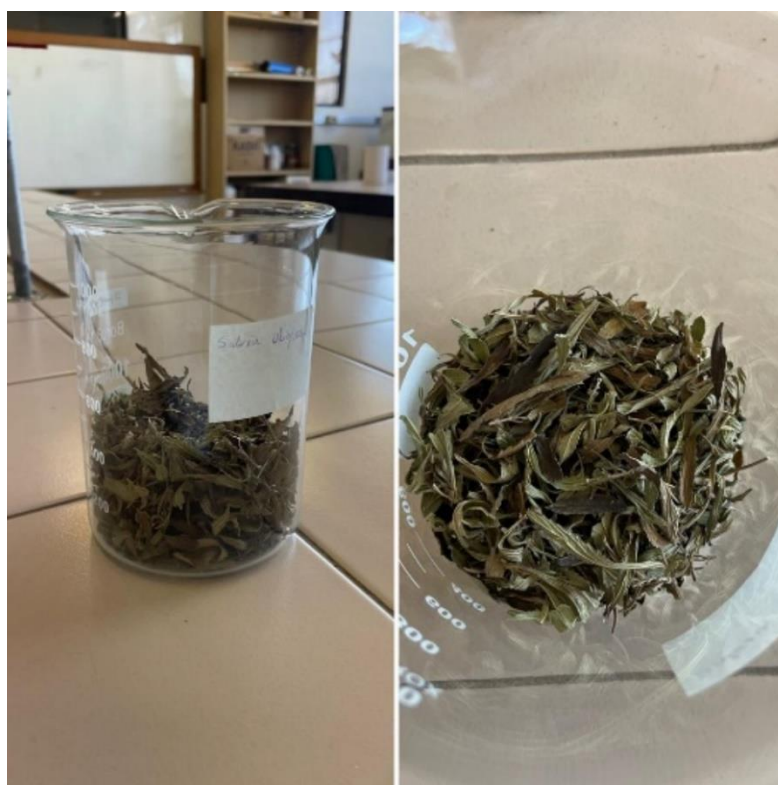


Figura 18. *Salvia uliginosa* ressecada usada para o exsudato.



Figura 19. Filtração dos exsudatos, demonstrando coloração característica. 1 *S. procurrans* e 2 *S. uliginosa*

O extrato obtido de *S. procurrans* apresentou uma cor mais alaranjada e o de *S. uliginosa*, cor mais próxima do amarelo (Figura 20).

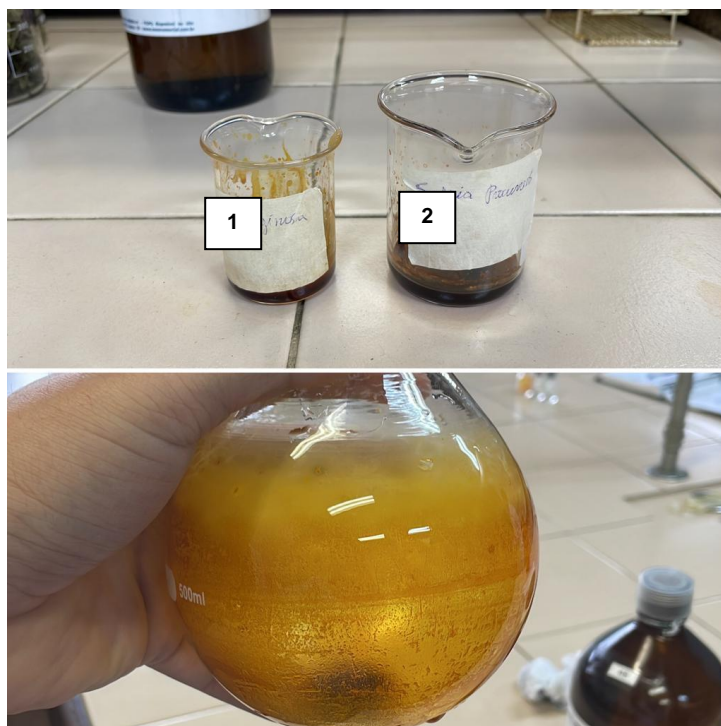


Figura 20. Exsudatos de *S. procurrens* e *S. uliginosa*. 1 *S. uliginosa*, 2 *S. procurrens*.

5.8. Atividade anti-*Candida* do exsudato de *S. uliginosa* e o isolado Icetexona

O exsudato de *S. uliginosa* e o isolado icetexona foram testados frente a cepas de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Inicialmente foi realizado o teste pela técnica de difusão em placas de Petry. O resultado é observado pela formação de halos de inibição. As leituras dos resultados foram realizadas em 24h e em 48h. Como controle positivo foi utilizado o itraconazol. Na Figura 21 mostra o crescimento de cada espécie de *Candida*, demonstrando que os fungos apresentaram crescimento normal. Estas placas serviram de controle negativo. O crescimento foi visualizado 24h e 48h após inoculação. Apenas a espécie *C. dubliniensis* não demonstrou crescimento, sendo este fundo desconsiderado neste teste.

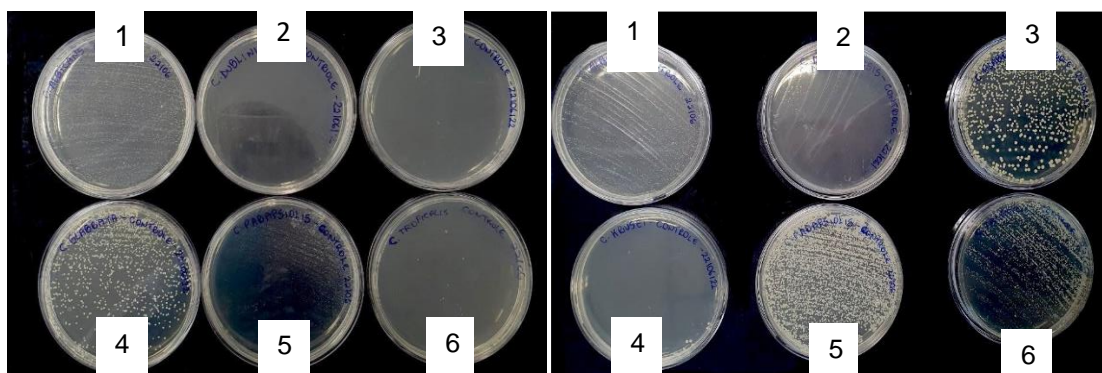


Figura 21. Controle negativo; 1 *C. albicans*, 2 *C. dublinienses*, 3 *C. krusei*, 4 *C. glabrata*, 5 *C. parapsilosis*, 6 *C. tropicalis*, 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.

A Figura 22 apresenta o resultado com o controle positivo itraconazol. O resultado foi a observação do halo de inibição em 24h e 48h após a inoculação de cada fungo. Foi observado pequeno halo de inibição para todos os fungos testados, exceto para *C. dublinienses*, para a qual não foi observado crescimento, sendo este resultado desconsiderado.

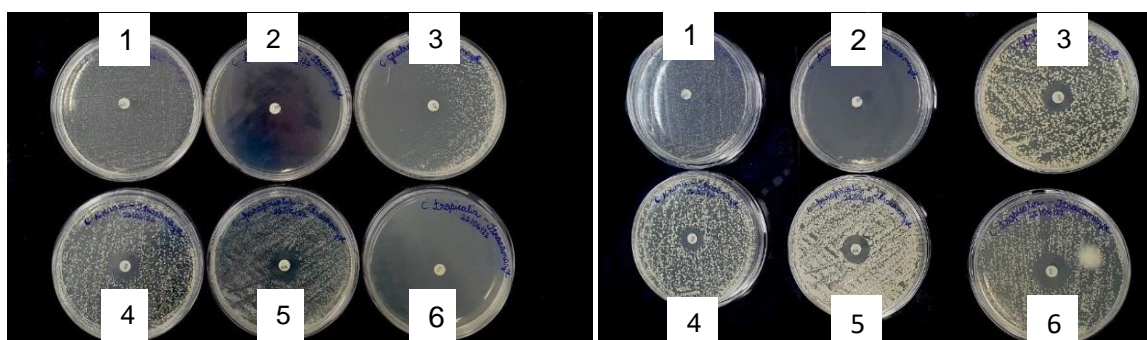


Figura 22. Controle positivo contendo itraconazol; 1 *C. albicans*, 2 *C. ccc*, 3 *C. glabrata*, 4 *C. krusei*, 5 *C. parapsilosis*, 6 *C. tropicalis*, 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.

O exsudato obtido a partir das folhas de *Salvia uliginosa* por extração com diclorometano foi submetido ao teste de difusão em placa de Petry (Figura 23). Um dos componentes deste exsudato, a icetexona, foi previamente isolada pelo grupo de trabalho sendo também testada (Figura 24). Observou-se ação seletiva para *Candida albicans*. Os demais fungos foram resistentes.

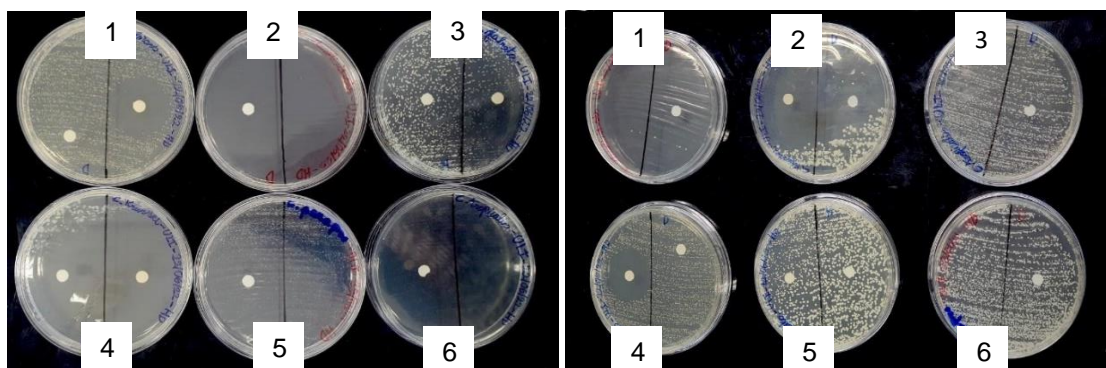


Figura 23. Placas contendo exsudato de *S. uliginosa*; 1 *C. albicans*, 2 *C. dublinienses*, 3 *C. glabrata*, 4 *C. krusei*, 5 *C. parapsilosis*, 6 *C. tropicalis*, 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.

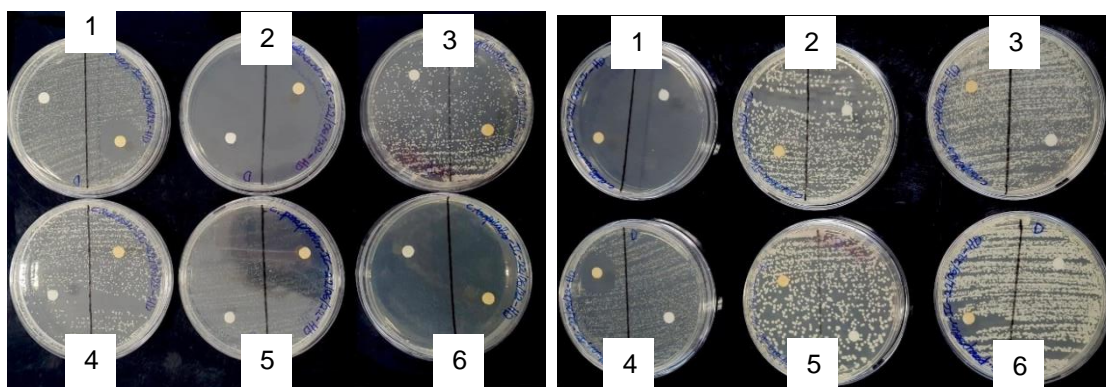


Figura 24. Placas contendo o isolado icetexona; 1 *C. albicans*, 2 *C. dubliniensis*, 3 *C. glabrata*, 4 *C. krusei*, 5 *C. parapsilosis*, 6 *C. tropicalis*, 24h (esquerdo) e 48h (direito) após a inoculação.

Os óleos voláteis obtidos das três espécies de *Candida* foram submetidos diretamente ao ensaio que avalia a concentração mínima inibitória (MIC). Devido à baixa quantidade de amostra destes óleos, a etapa de avaliação com disco em placa de Petry não foi realizada. Os óleos foram testados frente a quatro espécies de *Candida* e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7. Para este ensaio foram utilizados os óleos obtidos a partir das partes aéreas frescas de cada espécie. Pelos resultados observados, nenhum dos óleos apresentou atividade frente as espécies de *Candida*.

Tabela 7. Resultados do experimento do MIC com óleos voláteis das três espécies de *Salvia*.

	<i>S. uliginosa</i>		<i>S. procurrrens</i>		<i>S. ovalifoliaa</i>	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>C. albicans</i>	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml
<i>C. krusei</i>	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	1000 µg/ml	> 1000 µg/ml
<i>C. glabrata</i>	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml
<i>C. parapsilosis</i>	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml	> 1000 µg/ml

Na determinação do MIC para o exsudato obtido a partir de *S. uliginosa* e seu isolado, a icetexona, apenas *Candida albicans* foi utilizada, pois somente para esta espécie foi observado halo de inibição no ensaio de difusão em placa de Petry. A Tabela 10 apresenta os valores de MIC para estas amostras.

Tabela 8. MIC para confirmação do resultado com icetexona e exsudato de *S. uliginosa* frente a *Candida albicans*.

	Exsudato de <i>S. uliginosa</i>		Isolado Icetexona	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
<i>C. albicans</i>	250	> 1000	500	> 1000

No artigo de KATANIĆ STANKOVIĆ e colaboradores (2020) o extrato metanólico das partes aéreas de *Salvia verticillata* L. apresentou inibição em *Penicillium canescens* 5 µg/mL e 10 µg/mL em *Candida albicans* respectivamente.

No estudo de YANG et al., 2022 o carnosol, um diterpeno presente em espécies de *Salvia* como *Salvia officinalis* e também *Salvia fruticosa*, foi testado contra cepas de *Candida*. Esse estudo foi bastante importante pois mostrou que esse diterpeno possui capacidade de inibição que varia entre 12,5 a 100 µg/mL e também mostrou uma ótima ação contra a formação de biofilmes de *Candida albicans*.

AĆIMOVIĆ e colaboradores (2022) testou o óleo essencial da mesma espécie de *Salvia* colhidas em anos diferentes (2019, 2020 e 2021). O óleo obtido mostrou atividade contra os microrganismos testados, entre eles *Candida albicans*. O principal composto dos óleos obtidos foi a cis-tujona em 23,5%. Esse achado revela que apesar de fatores do clima, essa espécie ainda se manteve com forte ação contra microrganismos patógenos.

O artigo de BHATTACHARYA et al. (2015), em que um diterpeno clerodano identificado como 16α-hidroxicleroda-3,13(14) Z-dien-15,16-olide, que foi previamente isolado de *Polyalthia longifolia* var. *pendula* Linn. Esta é uma planta ornamental muito comum na Ásia, rica em diterpenoides, incluindo clerodano, e triterpenoides, usada também na medicina tradicional para tratamento de diversas enfermidades. O estudo deduz o mecanismo de ação desse diterperno frente a fungos patógenos, entre eles

C. albicans. O estudo para determinação da ação foi de observação através de microscopia de fluorescência, foi então possível observar que o diterpeno isolado comprometeu agindo primeiramente sobre a permeabilidade da membrana celular fúngica, depois tornando ela mais suscetível a entrada do isolado e por último provocando ruptura das estruturas da parede celular do fungo.

No nosso artigo o isolado icetexona, havia sido previamente isolado das partes aéreas de *S. procurrens* Benth, caracterizado como um pó amorfo alaranjado segundo CEZAROTO (2018). Não foram encontrados artigos que explicassem a ação antifúngica de icetexona contra *C. albicans*.

Acredita-se que a ação mais potente do exsudato de *S. uliginosa* em 24 horas 240 µg/ml seja devido a presença de compostos secundários como os isolados fruticulina A e a própria icetexona que estavam presentes no exsudato de CEZAROTO (2018).

5.9 Artigo publicado

Anti-Candida activity of terpenes from *Salvia ovalifolia*, *S. procurrens* and *S. uliginosa*, native to South Brazil

Cristiano da Silva Sousa^a, Leticia Mezzomo^a, Juliana Butzge^a, Gabriela de Carvalho Meirelles^a, Sérgio Augusto de Loreto Bordignon^a, Gilsane Lino von Poser^a, Miriam Anders Apel^{b,c}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; ^bPostgraduate Program of Environmental Impact Assessment UNILASALLE University, Canoas, RS, Brazil

^cCorresponding author: miriam.apel@ufrgs.br

The essential oils of *Salvia ovalifolia*, *S. procurrens* and *S. uliginosa* were obtained by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The three species displayed very low amounts of essential oils, consisting of a few sesquiterpenes, and aliphatic compounds such as aldehydes and long-chain fatty acids. From the leaves of *S. uliginosa*, an exudate was obtained which presented the diterpene icetexone as the major component. The exudate and icetexone were evaluated for the activity against *Candida* species, both showing inhibition of fungal growth.

Keywords: *Salvia*, Lamiaceae, terpenes, HPLC analysis, *Candida*.

Article received at 11/15/2022 and accepted at 12/21/2022.
<https://doi.org/10.22456/2527-2616.128293>

Introduction

The Lamiaceae family contains 236 genera and about 7,173 species, widespread all over the world, not found only in the coldest regions of high latitude (1). The largest genus of the family is *Salvia* L., comprising ca. 900 species of cosmopolitan distribution (2), with major centers of diversity in East and West Asia and Central and South America. The genus thrived specially in America where ca. 500 species belonging to the subgenus *Cinophora* (Benth.) Epling have been described. This subgenus is exclusively American and groups the majority of the species of the genus (1). In Brazil, 68 species were found being 47 endemics to the country (3). The phytochemical investigation of the genus *Salvia* indicates the presence of diterpenes (4-6) and essential oils (7) as the main constituents. Due to the presence of these important groups of natural compounds, *Salvia* species are used in the traditional medicine, as well as used in the manufacture of perfumes, cosmetic and toiletry products.

Previous studies have demonstrated the antiprotozoal activity of the exudate of *Salvia uliginosa* and its main diterpene, icetexone (8). In this context, the purpose of this study was to characterize the essential oils obtained by hydrodistillation from *Salvia* species native to southern Brazil (*S. ovalifolia*, *S. procurrens* and *S. uliginosa*), using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Furthermore, the essential oils, the exudate and an isolated diterpene, icetexone, were evaluated concerning the antifungal effect against *Candida* spp.

Materials and Methods

Plant Material

The plants (*S. ovalifolia*, *S. procurrens* and *S. uliginosa*) were collected in the Rio Grande do Sul state, South Brazil (SisGen-Brazil access registration AAEF4), and voucher specimens were deposited in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BCN).

Essential oils extraction

One hundred grams of fresh aerial parts of *S. ovalifolia*, *S. procurrens* and *S. uliginosa* were submitted to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus, for 4 h. The oils were collected, dried over anhydrous sodium sulphate and stored in the dark, at -20 °C, until the GC-MS analyses. The yields were expressed as volume (mL) of essential oil per 100 g of fresh plant material.

GC-MS analyses

For chemical analysis, the essential were diluted in ethyl ether at a ratio 2:100 (v/v). The chemical composition was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) (Shimadzu QP5000) equipped with a capillary column of fused silica Durabond-DB5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). The injector and detector temperatures were set at 220 °C and 250 °C, respectively, using a column temperature programming of 60 °C to 300 °C at 3 °C.min⁻¹, with helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. Ionization of the sample components was performed in the EI mode (70 eV). The injected volume was 1 µL. The identification of compounds was based on the comparison of retention indices calculated by linear interpolation

relative to retention times of a series of n-alkanes (C8–C23), and their mass spectra with authentic samples and with data collected from the literature (9) and also by comparison with mass spectra recorded in the database of NIST 62 and NIST 12 (National Institute of Technology and Standards). The relative amounts of the components were calculated based on GC peak areas by normalization.

Exudate preparation

Aerial parts of *S. albigosa* (50 g) were immersed in dichloromethane in an amount sufficient to cover the plant material. After 30 s, the extract was filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude exudate was partitioned by column chromatography over silica gel using mixtures of n-hexane and dichloromethane of increasing polarity as mobile phase. A main compound was obtained and identified as the diisoprenic icotexone by comparison with an authentic sample.

Exudate analysis

The qualitative analysis of exudate was performed using a HPLC method previously validated (not published data). The analyses were achieved using on a Waters 2695 instrument with a 2998 PDA detector. The separations were fulfilled with a system composed by water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% of formic acid. A gradient system of 10→100% (B) in 30 minutes was applied, followed by 70→10% (B) for 20 minutes. A Waters Nova-Pack C18 column (4 µm, 3.9 mm x 150 mm) attached to a guard column Waters Nova-Pack C18 60 Å (3.9 mm x 20 mm). The column flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 10 µL. The detector sensibility was 1 AUFS and the analysis was performed in λ= 330 nm at 25 °C.

Evaluation of the antifungal activity

Microorganisms

The microorganisms selected for this study were provided by the Biomicrobiolab Laboratory (Mycology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul). The fungi used were five species of the genus *Candida*: *C. albicans* (ATCC 24433), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. tropicalis* (ATCC 2551) and *C. parapsilosis*. All strains were stored in Tryptone Soya Broth (TSB; Himedia®) plus 10% glycerol and frozen at -18 °C. At the time of use, the strains were reactivated by inoculating 10 µL of the stock culture in tubes with Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (Kasvi®), and incubated at a temperature of around 30 °C for 48 h.

Disk diffusion test

The disk diffusion test to evaluate antifungal activity was performed as a screening, determining the size of the

zones of inhibition (mm) produced by the samples against the *Candida* strains. The fungal suspension of each test strain was prepared and using the Bio-Spectrophotometer SP-220, the suspension was adjusted to 1×10^6 CFU (Colony Forming Units), turbidity corresponding to 0.5 on the McFarland scale. This suspension was spread on sterile Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar culture medium with chloramphenicol (Kasvi®). The test was performed following the protocol described in document M44 of the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (10). Filter paper discs (diameter of 10 mm) were impregnated with 15 µL of each oil sample and placed on the surface of the previously inoculated medium. The plates were incubated at 30 °C and the inhibition zones were read after 48 h. The antifungal used as positive control was itraconazole, 10 µg discs (Cicon / Brazil) and the breakpoints used were that recommended by document M44 of CLSI (10), in which ≥20 mm halo means sensitive, 15 mm-19 mm halo means dose dependent/sensitive intermediate and ≤14 mm halo means resistant. The active samples were selected for further study for determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was carried out by the broth microdilution method, as recommended by the CLSI (11). The samples were dissolved in dimethyl sulfoxide - DMSO (Nuclear®). The concentration range used for samples was $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $3.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The fungal suspensions were prepared in the same way as in the disk diffusion test, resulting in 1×10^6 CFU.mL⁻¹ (Colony Forming Units), turbidity corresponding to 0.5 on the McFarland scale. Dilutions were subsequently made, 1:50 in 0.85% sterile saline and then again diluted 1:20 with RPMI 1640 (Sigma Aldrich®), resulting in a final suspension of 1×10^7 CFU.mL⁻¹. The microplates were incubated at 30 °C and inspected after 24 h for visual verification of growth (10-12). The experiment was carried out in duplicate. MIC was defined as the lowest concentration of essential oil in which it was not possible to see any growth when compared to controls.

Results and Discussion

The *Salvia* species exhibited very low amounts of essential oils, confirming previous preliminary studies by our research group (13). Chemical analysis of the essential oils demonstrated that all species presented only sesquiterpenes, and aliphatic compounds such as aldehydes and long chain fatty acids (Figure 1). Among the latter, nonadecanal was found in all species, being abundant in *S. procurrens* and *S. ovalifolia* (19.9% and 11.3%, respectively). Regarding the composition of the sesquiterpenes, it was observed the occurrence of α-bisabolol in relatively large amounts (17.3%) in *S. ovalifolia* oil. This species also showed the presence of sesquiterpene α-guianene in quantity inferior to 0.1%.

Salvia uliginosa essential oil was characterized by nonadecanal (40.2%) and heptadecanone (25.6%). In this species, hexadecanoic acid was observed only in traces.

Among the three species investigated, only *S. uliginosa* was previously assessed in more details regarding the essential oils (2). Interestingly, this plant, cultivated in Europe, exhibited a different composition. The extraction yield was also very low (0.02%) but other compounds were found. Sesquiterpenes represent the most abundant terpene fraction (89.56%). The main compound was bicyclogermacrene (16.3%) followed by germacrene D (14.8%), β -caryophyllene (8.6%) and β -calicene (8.5%), among the hydrocarbons. Spathulenol (12.7%) dominated the oxygenated sesquiterpene fraction.

Salvia uliginosa was also previously investigated by our research group regarding the diterpene composition. Cezotto et al. (8) reported the occurrence of icetexane-type diterpenes, present in glandular trichomes found in the aerial parts of the plant. Of these diterpenes, a major component was identified as icetexone (Figure 1).

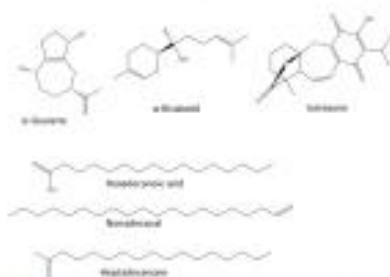


Figure 1. Chemical structure of the main compounds.

The exudate obtained in this study, analyzed by HPLC, showed the presence of several components, some of them with an ultraviolet profile of the icetexane diterpenes. By the chromatogram, it was observed that the main compound exhibits the same retention time and UV profile of icetexone.

In order to verify the susceptibility of strains of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* against the *S. ovalifolia*, *S. procurrens*, *S. uliginosa* essential oils, *Salvia uliginosa* exudate and icetexone, tests were performed to evaluate the antifungal activity of the samples. The anti-*Candida* activity was assessed by agar disk diffusion method and further by Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The results of the diffusion disk test, used as a screening, are shown in Table 1, in which the sizes of the inhibition halos are presented, in mm, and were obtained with the tested samples and with itraconazole, the antifungal used in this assay as positive control. None of essential oils demonstrated activity against the *Candida* species, since no inhibition zones were observed. Concerning itraconazole, *C. albicans* showed no inhibition zone, being, therefore, resistant to the antifungal substance control. The strain of *C. tropicalis* showed a 20 mm

inhibition zone with the itraconazole disk, thus being sensitive to this antifungal. Considering *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*, the positive control demonstrated intermediate action with a 15 mm halo inhibition.

Differently from the essential oils, *S. uliginosa* exudate and icetexone were active against *C. albicans*, displaying inhibition zones of 30 mm and 25 mm, respectively (Figure 2). It must be considered that icetexone was isolated from *S. uliginosa*, where this diterpene is the major compound in the dichloromethane exudate and seems to be, at least, one of the active substances responsible for the observed effect.

Table 1. Size of inhibition halos (mm) of itraconazole (ITRA) and tested samples against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*.

Candidate sp.	ITRA	<i>Salvia uliginosa</i> exudate	Icetexone
<i>C. albicans</i>	10	30	25
<i>C. glabrata</i>	15	NI	NI
<i>C. krusei</i>	15	NI	NI
<i>C. parapsilosis</i>	15	NI	NI
<i>C. tropicalis</i>	20	NI	NI

NI: no inhibition halo

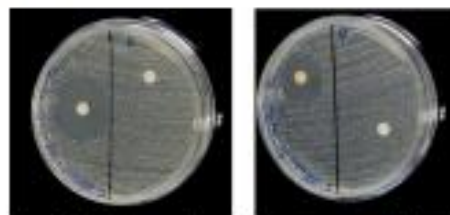


Figure 2. Inhibition zone by disc-diffusion test with *Salvia uliginosa* exudate (left) and icetexone (right). The disks in the right part of the plates contain the solvent used to dilute the samples (dichloromethane) which showed no effect against the fungi.

In the disk diffusion test the best results were obtained with the exudate of *S. uliginosa* and with icetexone against *C. albicans*. Thus, these samples were selected to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The MIC values obtained with the *S. uliginosa* exudate and icetexone, against *C. albicans* were 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. It is interesting to note that the exudate of *S. uliginosa* showed better MIC compared to icetexone, confirming that the diterpene alone, although it is the major component of the exudate, is only one of those responsible for the effect observed against *C. albicans*.

Although no reports on the antifungal property of *S. uliginosa* exudate were found in the literature, other biological activities were reported. Cezotto et al. (8) identified potent antichemotactic and leishmanicidal effects in diterpenes isolated from *S. uliginosa* exudate.

The diterpenes isolated were isociclotenone (IsocT), icetexone diterpenes (ICT) and 7-acetoxy-6,7-dihydroicetexone, of which the first two showed high leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis*.

Conclusions

The results reported here highlight the biological properties of *S. uliginosa* essential and corroborate its potential as a new antifungal therapeutic alternative.

Acknowledgments

We are grateful to CNPq for fellowship and financial support.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Jiahu S, Peipsi S, Chuanzhi K, Lanyue Z, Laping G. Chemical composition and biological activities of essential oils from six Lamiaceae folk medicinal plants. *Front Plant Sci.* 2022; 13:1-919294.
2. O'Leary N, Moroni P. Tipificaciones en *Salvia* (Lamiaceae). *Novon: A J Bot Nomencl.* 2016; 24(4): 373-379.
3. *Salvia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8296>>. Accessed in October 2022.
4. Kabouche A, Kabouche Z. Bioactive diterpenoids of *Salvia* species. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 35, 2008.

5. Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, Cong B. Constituents from *Salvia* and their biological activities. *Chem Rev.* 2012; 112:5967-6026.
6. Karlija E, Dahiya S, Tarkowski P, Zeljković S. Influence of Climate-Related Environmental Stresses on Economically Important Essential Oils of Mediterranean *Salvia* sp. *Front Plant Sci.* 2022; 13: 864807.
7. Cezarotto CS, Dorneles A, Baldissera FG, da Silva MB, Marqueski MM, Júnior LCR, Peres A, Fazole T, Bordignon SAL, Apel MA, Rosrio PRT, von Poser GL. Leishmanicidal and antichemotactic activities of icetexane from *Salvia uliginosa* Benth. *Phytomedicine.* 2019; 58:152748.
8. Adams RP. Editor. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Carol Stream (IL): Allured Publishing, 2017. E-book.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M44, 2018.
10. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M60. 2017;1-12.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution, M27-A3 Ref. Method Broth Dilution Antifung. Susceptibility Test. Yeasts; *Approved. Stand. - Third Ed.* 2008; 28(14).
12. Pinto PS. Terpenóides em espécies do gênero *Salvia* (Lamiaceae) [dissertation]. Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
13. Giuliani C, Ascenzi R, Tani C, Botton M, Bini LM, Flamini G, Fico G. *Salvia uliginosa* Benth.: Glandular trichomes as bio-factories of volatiles and essential oil. *Flora.* 2017; 233:12-21.

6. CONCLUSÕES

- No presente trabalho foi possível observar a similaridades químicas presentes nas espécies de *Salvia* encontradas no Rio Grande do Sul.
- De maneira geral, os óleos das três espécies de *Salvia* mostraram predominância em sesquiterpenoides seguido de ácidos graxos em sua composição;
- Foi possível observar diferença quantitativa dos compostos presentes nos óleos essenciais de *Salvia procurrens* uma vez que o óleo da espécie seca apresentou maior concentração dos compostos majoritários;
- O composto nonadecanal esteve presente em todas as amostras, seguido de ácido hexadecanoico, que só não esteve presente no óleo de *Salvia uliginosa* seca;
- O exsudato de *Salvia uliginosa* e o isolado icetexona usados no teste de difusão de placa de petry, mostraram ação contra *Candida albicans* após 24 e 48 horas;
- Entre os óleos essenciais testados, apenas o de *Salvia ovalifolia* exibiu ação de inibição 1000 µg/mL no tempo de 24h contra *Candida krusei*;
- O exsudato de *Salvia uliginosa* apresentou concentração inibitória mínima de 250 µg/mL em 24h;
- O isolado icetexona apresentou concentração inibitória mínima de 500 µg/mL, demonstrando ser um dos responsáveis pela ação anti-*Candida albicans* observada.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publishing Corporation, IL, USA. 2017.
- ALBERTO, C.M.; SANZO, A. M.; XIFREDA, C.C. Chromosomal studies in species of *Salvia* (Lamiaceae) from Argentina. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 483-490, 2003.
- BACH, T.J. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants-a review. **Lipids**, v. 30, n. 3, p. 191-202, 1995.
- BAŞER, K. HÜSNÜ, C.; DEMIRCI, F. Chemistry of essential oils. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**, edited by Berger RG. **New York: Springer**, p. 43-86, 2007.
- BEKUT, M. et al. Potential of selected Lamiaceae plants in anti (retro) viral therapy. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 301-314, 2018.
- BURKART, A. Las especies de Mimosa de la Flora Argentina. **Darwiniana**, v. 8, n. 1, p. 9-231, 1948.
- CANZONERI, Marisa et CANZONERI, Marisa et al. Chemical composition and biological activity of *Salvia verbenaca* essential oil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 1934578X1100600725, 2011.
- CHENG, A-X. et al. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 179-186, 2007.
- COX, S.D.; MARKHAM, J.L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 930-936, 2007.
- CROTEAU, Rodney et al. **Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids**. Springer, 2003.
- DE MACEDO, L.M. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications: A review. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 651, 2020.
- DE OLIVEIRA CARVALHO, I. et al. In vitro anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. **Archives of Oral Biology**, v. 117, p. 104834, 2020.
- GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R.S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57-78, 2019.

GHORBANI, A.; ESMAELIZADEH, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 433-440, 2017.

GIULIANI, C. et al. *Salvia uliginosa* Benth.: Glandular trichomes as bio-factories of volatiles and essential oil. **Flora**, v. 233, p. 12-21, 2017.

HOU, T. et al. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. **Food Bioscience**, p. 101716, 2022.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Óleos essenciais na conservação de alimentos: modo de ação, sinergias e interações com componentes da matriz alimentar. **Frente. Microbio**. v. 3, p.12, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012

JENKS, A.A.; WALKER, J.B.; KIM, S.-C. Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbA-trnH) and nrDNA (ITS) sequence data. **Journal of Plant Research**, v. 126, n. 4, p. 483-496, 2013.

KAMATOU, Guy PP; VILJOEN, Alvaro M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KAYSER, O. Ethnobotany and medicinal plant biotechnology: from tradition to modern aspects of drug development. **Planta Medica**, v. 84, n. 12/13, p. 834-838, 2018.

KRISHNAMOORTHY, R. et al. Antifungal activity of nanoemulsion from *Cleome viscosa* essential oil against food-borne pathogenic *Candida albicans*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 286-293, 2021.

LICHTENTHALER, H.K.; ROHMER, M.I; SCHWENDER, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 101, n. 3, p. 643-652, 1997.

LOMBARD, J.; MOREIRA, D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 87-99, 2011.

LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M.I. **Terpenoids. Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies**. Academic Press. 2017, p. 233-266.

MAFFEI, M.E.; GERTSCH, J.; APPENDINO, G.I. Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 8, p. 1359-1380, 2011.

MAHBOUBI, M. Clary sage essential oil and its biological activities. **Advances in Traditional Medicine**, p. 1-12, 2020.

MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 366-373, 2002.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015, 1995.

NUZHAT, T.; VIDYASAGAR, G.M. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 19-28, 2013.

PANDEY, A.K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N.N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 682-694, 2014.

PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PINTO, P.S. **Terpenoides em espécies do gênero *Salvia* (Lamiaceae)**
Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O.; MAIA-PORTE, L. H. Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 438-441, 2013.

POULIOS, E.; GIAGINIS, C.; VASIOS, G.K. Current state of the art on the antioxidant activity of Sage (*Salvia spp.*) and its bioactive components. **Planta Medica**, v. 86, p. 224-238, 2020.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SOUSA, C.; MENDES, A.F. Monoterpenes as Sirtuin-1 Activators: therapeutic potential in aging and related diseases. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, p. 921, 2022.

SRIVASTAVA, V.; SINGLA, R.K.; DUBEY, A.K. Emerging virulence, drug resistance and future anti-fungal drugs for *Candida* pathogens. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 759-778, 2018.

YANG, Longfei et al. Carnosol inhibits the growth and biofilm of *Candida albicans*. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, n. 2, p. 101234, 2022.